

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS MEDIANTE
SECUENCIACIÓN DEL GEN ARNr 16S EN UN AMBIENTE
AGRÍCOLA PARA LA PRODUCCIÓN DE MELÓN
(*Cucumis melo* L.)

Por

LBG VÍCTOR EDUARDO MERCADO GUAJARDO

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGIA

Junio 2018

ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS MEDIANTE
SECUENCIACIÓN DEL GEN ARNr 16S EN UN AMBIENTE
AGRÍCOLA PARA LA PRODUCCIÓN DE MELÓN
(*Cucumis melo* L.)

Comité de Tesis

Dr. José Santos García Alvarado

Presidente

Dr. Eduardo Franco Frías

Secretario

Dra. Norma Laura Heredia Rojas

Vocal

Dr. José Ángel Merino Mascorro

Vocal

Dra. Luisa Yolanda Solís Soto

Vocal

ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS MEDIANTE
SECUENCIACIÓN DEL GEN ARNr 16S EN UN AMBIENTE
AGRÍCOLA PARA LA PRODUCCIÓN DE MELÓN
(*Cucumis melo* L.)

Director de Tesis

Dr. José Santos García Alvarado

Director

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. José Santos García Alvarado por la oportunidad de realizar este proyecto bajo su asesoría y dirección en el laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos.

A la Dra. Norma Heredia Roja, Dra. Luisa Yolanda Solís, Dr. Merino y al Dr. Eduardo Francos Frías por su asesoría y apoyo durante mi estancia en el laboratorio y por formar parte del comité de investigación.

De igual manera quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio, Ana, Alberto, Janeth, Fernanda, Yara y Alondra por su apoyo y grata compañía a lo largo del tiempo que estuve entre sus filas realizando este proyecto.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ciencias biológicas por darme la oportunidad de cursar la maestría en Microbiología.

Agradezco a CONACYT por el apoyo económico que me brindaron durante la realización de la maestría y esta investigación.

DEDICATORIAS

Quiero dedicar este proyecto a mis padres Juan Manuel Mercado Alvares y Ana Guajardo Hernández por apoyarme en todo momento de mi vida y darme el apoyo que me dieron durante toda mi vida para poder llegar a la realización de esta Tesis.

De igual manera quiero agradecer a mis hermanos y familiares por brindarme apoyo durante mis estudios universitarios para culminar en la realización de esta maestría.

INDICE

	Pagina
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Las poblaciones microbianas	3
2.2 Técnicas para el análisis de las poblaciones microbiana	3
2.3 Análisis de poblaciones bacterianas en base a secuencias nucleotídicas	4
2.4 La metagenómica y la exploración de las poblaciones bacterianas	6
2.5 Incorporación de la secuenciación en la inocuidad alimentaria	7
2.6 Estudios de poblaciones bacterianas en productos vegetales	8
2.7 El melón como un foco de problemas en inocuidad alimentaria	9
3. JUSTIFICACION	12
4. HIPOTESIS	13
5. OBJETIVOS DEL TRABAJO	14
6. MATERIALES Y METODO	15
6.1 Recolección de muestras	15
6.2 Muestreo de lavados de melones	15
6.3 Muestreo de lavado de manos	16
6.4 Muestreo y caracterización del suelo	16
6.5 Extracción de ADN	17
6.6 Secuenciación	18
6.7 Procesamiento de las lecturas	19
6.8 Análisis de las lecturas	21
6.9 Clasificación taxonómica de las especies	21
6.10 Análisis estadísticos	22
7. Resultados	23
7.1 Condiciones del ambiente	23
7.2 Análisis de las lecturas y conteo de OTUs	24

7.3	Análisis de alfa diversidad	25
7.3.1	Análisis de diversidad filogenética	25
7.3.2	Índice de uniformidad	28
7.4	Análisis de beta diversidad	30
7.5	Identificación de los microorganismos presentes en las muestras	31
7.5.1	Clasificación taxonómica	32
7.5.2	Mapas de calor de la abundancia relativa	33
7.5.2.1.1	Clases	34
7.5.2.1.2	Orden	35
7.5.2.1.3	Familia	36
7.5.2.1.4	Genero	38
7.5.3	Abundancia relativa de enteropatógenos y fitopatógenos	39
8.	Discusión	41
9.	Conclusiones	48
10.	Anexos	49
10.1	Anexo 1: análisis estadísticos	49
11.	Bibliografía	52

INDICE DE TABLAS

	Pagina
Tabla 1. Códigos de barra para la identificación de las lecturas de cada muestra.	19
Tabla 2. Conteo de lecturas obtenidas en cada una de las muestras tras la secuenciación y el conteo de lecturas que quedaron tras procesar las muestras.	20
Tabla 3. Coordenadas, tipo de suelo, pH y numero de muestra para cada una de las huertas de melón.	23
Tabla 4. Unidades taxonómicas operaciones creadas en cada una de las muestras.	25
Tabla 5. Abundancia Relativa de los principales patógenos encontrados en frutos y su ambiente.	39
Tabla 6. A Abundancia relativa porcentual de géneros de Bacterias fitopatógenas encontradas en las muestras.	40
Tabla 7. Kruskal-Wallis por pares del análisis de diversidad filogenética entre huerta.	49
Tabla 8. Kruskal-Wallis por pares del análisis de diversidad filogenética entre tipo de muestras.	49
Tabla 9. Kruskal-Wallis por pares del análisis de diversidad filogenética entre muestras separadas por la huerta de procedencia.	50
Tabla 10. Kruskal-Wallis por pares del análisis de uniformidad entre huertas.	50
Tabla 11. Kruskal-Wallis por pares del análisis de uniformidad entre tipo de muestras.	50
Tabla 12. Kruskal-Wallis por pares del análisis de uniformidad entre tipo de muestras separadas por su huerta de procedencia.	51

I. INDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Representación esquemática del gen del ARNr 16S.	5
Figura 2. Gráfica de refracción de los OTUs observados en las diferentes muestras a un muestreo aleatorio de lecturas de 50,000.	24
Figura 3. Diagramas de cajas del índice de diversidad filogenética de las tres visitas de las huertas A y B. a) Índice de diversidad filogenética de las huertas. b) índice de diversidad filogenética del tipo de muestra, c) índice de diversidad filogenética de las muestras separadas por tipo de muestras y huerta de procedencia.	27
Figura 4. Diagramas de cajas del índice de uniformidad de Pielou de las tres visitas de las huertas A y B a) Índice de igualdad de las huertas. b) índice de igualdad del tipo de muestra, c) índice de igualdad de las muestras separadas por tipo de muestra y huerta de procedencia.	29
Figura 5. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las muestras de las tres visitas de las huertas A y B. a) PCoA del índice de Jaccard, b) PCoA del índice de Bray-Curtis.	31
Figura 6. Frecuencia relativa de los filos identificados en las lecturas de las muestras de melón, manos y suelo de las huertas A y B.	33
Figura 7. Mapa de calor con las 30 clases más abundantes acomodado con un análisis jerárquico de conglomerados basado en las abundancias relativas en las muestras de suelo, melón y manos de las huertas A y B.	35
Figura 8. Mapa de calor con las 30 ordenes más abundantes acomodado con un análisis jerárquico de conglomerados basado en las abundancias relativas en las muestras de suelo, melón y manos de las huertas A y B.	36
Figura 9. Mapa de calor con las 30 familias más abundantes acomodado con un análisis jerárquico de conglomerados basado en las abundancias relativas en las muestras de suelo, melón y manos de las huertas A y B	37

Figura 10. Mapa de calor con los 30 géneros más abundantes acomodado con un análisis jerárquico de conglomerados basado en las abundancias relativas en las muestras de suelo, melón y manos de las huertas A y B.

38

II. LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

1. %: por ciento.
2. (p/v): porcentaje entre el peso del soluto y el volumen de la solución.
3. ADN: Ácido Desoxirribonucleico.
4. ARN: Ácido Ribonucleico.
5. BLAST: herramienta de búsqueda de alineamientos locales básicos (Basic local alignment search tool).
6. Hz: Hertz.
7. min: minutos.
8. OTUs: Unidades taxonómicas operacionales.
9. PCoA: Análisis de coordenadas principales.
10. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
11. pH: Potencial de hidrogeno.
12. QIIME2: Conocimientos cuantitativos sobre la ecología microbiana (Quantitative Insights Into Microbial Ecology).
13. RFLP: Polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción.
14. rpm: revoluciones por minuto.
15. s: segundos.
16. SAGARPA: Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.
17. CDC: Centro del control y prevención de enfermedades.

III. RESUMEN

En los últimos años, las tecnologías de secuenciación de DNA han sido implementadas en productos alimenticios para conocer su microbiota nativa incluyendo microorganismos benéficos, o bien deteriorantes para el alimento y/o patógenos al consumidor sin la necesidad de aislarlos por microbiología convencional. En el presente trabajo se realizó un estudio de las poblaciones bacterianas de muestras de fruto, suelo y manos de los pizcadores en dos huertas productoras de melón (*Cucumis melo* L.)

Para ello, las muestras recolectadas fueron sometidas a extracción de ADN y se enviaron a secuenciar mediante la tecnología Illumina. En el análisis de resultados se encontró que las poblaciones bacterianas son similares en ambas huertas, sin embargo, al comparar las muestras se encontró que el suelo presenta una mayor biodiversidad en comparación a lo encontrado en el melón y las manos de los pizcadores, estas dos últimas, presentan una diversidad taxonómica similar. Los filos dominantes en el ambiente donde se cultiva el melón son *Proteobacteria* (80-90% de abundancia relativa), *Firmicutes* (1-10%), y *Actinobacteria* (<1% en melón y manos; 10-20% en suelos). Además se logró la detección de bacterias de los géneros *Escherichia* (1.64-3.45%), *Salmonella* (0.3-4.42%) y *Listeria* (4.76%), los cuales se han asociado como responsable de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Así mismo se identificaron fitopatógenos que pueden afectar la producción de melón, en donde se detectaron taxones de *Acidovorax* (0.19-0.26%) y *Pectobacterium* (0.04-0.9%), los cuales han sido reportados como fitopatógenos que dañan al fruto del melón, causando la aparición de manchas en el producto, con una pérdida económica de hasta el 90% del producto.

ABSTRACT

In the last years the DNA sequencing technologies have been implemented in food to study the naïve microbiota, which includes beneficial microorganisms, as well as food deteriorating & pathogens without the need to isolate them by conventional microbiology methods. In this study we conducted a study about the bacteria communities present in cantaloupe (*Cucumis melo* L), soil and handler's hands of two cantaloupe producing Orchards.

For this, the samples were treated for DNA extraction and were sequenced using Illumina sequencing technology. In the results we found that the bacteria populations between farms are similar, however, when the samples were compared, we found that soil has greater biodiversity compared to melon and hands, which had similar taxonomic diversity. The dominant phyla in the environment were *Proteobacteria* (80-90% of the relative abundance), *Firmicutes* (1-10%), and *Actinobacteria* (<1% in melon and hands; 10-20% in soil). Also, we managed to identify the presence of *Escherichia* (1.64-3.45%), *Salmonella* (0.3-4.42%) and *Listeria* (4.76%), which have been associated with outbreaks related to food consumption. Likewise, we identified phytopathogens reported that could cause harm to the melon's plant, in which, *Acidovorax* (0.19-0.26%) and *Pectobacterium* (0.04-0.9%) were detected, these taxons have been reported as phytopathogens that damage the fruit causing spots in the fruit, producing an economical loss up to 90% of the product.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha habido interés en el estudio de los microorganismos presentes en el ambiente, entendiendo la interacción entre estos con otras poblaciones y factores abióticos. El suelo presenta una gran diversidad de microorganismos, agrupando hasta 10 billones de estos y más de 1000 especies diferentes por cada gramo (Delmont *et al.* 2011). Se conoce como microbiota a los microorganismos presentes en un ecosistema dado, que participan en múltiples reacciones y pudieran causar efectos nocivos para el ambiente donde se encuentran (Hill *et al.* 2000). Con frecuencia, muchos microorganismos presentes en muestras ambientales no pueden ser aislados por técnicas microbiológicas convencionales de laboratorio, por lo que recientemente se ha optado por el uso de técnicas moleculares y bioinformáticas para ello (Kunin *et al.* 2008), dando lugar a la era de la metagenómica (Handelsman *et al.* 1998), que ha permitido el análisis de diferentes ecosistemas para la búsqueda de genes de interés como agentes antimicrobianos, productos metabólicos y enzimas (Daniel, 2004). La metagenómica ha sido utilizada para la detección de factores de virulencia o genes de resistencia a diferentes antibióticos en abono (Su *et al.* 2014), suelos y plantas de diferentes cultivos (Popowska *et al.* 2011; Belda-Ferre *et al.* 2011).

Con la intención de mejorar la inocuidad de los alimentos, se han implementado sistemas de secuenciación y caracterización de la microbiota nativa de diferentes productos, a fin de poder elucidar la interacción de estas poblaciones con el producto durante su procesamiento, resguardo y los cambios que estas causan en los alimentos (Cao *et al.* 2017). Además de la interacción de estas poblaciones nativas con los patógenos presentes que pueden ser dañinos para los consumidores (Sekse 2017). Los estudios de poblaciones bacterianas en alimentos se han dado principalmente en la línea de procesamiento y en productos fermentados (Mayo *et al.* 2014), por lo que la información sobre la interacción de poblaciones bacterianas con productos frescos y listos para consumo es limitada, a pesar de que una gran parte de los brotes reportados han sido por consumo este tipo de productos (FSN 2015; Callejón *et al.* 2015).

En lo que respecta a la producción de melón, México exporta a nivel mundial más de 603 mil toneladas de producto al año, principalmente a Estados Unidos y Japón (SAGARPA, 2016), con altos estándares de calidad, lo que deriva en la necesidad de identificar microorganismos presentes en los suelos de cultivo y evitar la propagación de microorganismos deteriorantes o patógenos, lo cual puede ocasionar repercusiones monetarias.

Debido a la importancia de este producto en la economía nacional, conocer a todos los microorganismos que interactúan con el melón en los cultivares será de gran utilidad para identificar puntos de riesgo de contaminación en campo. Es por ello que esta investigación se enfocó en la identificación de bacterias presentes en la microbiota de ambientes agrícolas de producción de melón mediante el uso de herramientas moleculares y bioinformáticas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Las poblaciones microbianas

La microbiota se define como el grupo de microorganismos que viven en un entorno específico, pudiendo ser hongos, bacterias, virus y protistas (Peterson *et al.* 2009; Geisen 2016). Estos microorganismos juegan un papel importante en la producción, regulación y ciclo de nutrientes en suelo (Heritage *et al.* 1999) y agua de mar (Li *et al.* 2016), interacción simbiótica o patógena con hospederos vegetales (Bulgarelli *et al.* 2016) o animales (Kostic *et al.* 2013) o en procesos de fermentación de alimentos (Caplice y Fitzgerald 1999).

La importancia de estudiar estas poblaciones radica en su utilidad para la predicción de cambios que sufre el ecosistema causados por el ambiente (Pajares *et al.* 2016). Una de las principales dificultades en el estudio de las poblaciones microbianas es que aproximadamente solo el 1% del total de microorganismos presentes en el suelo pueden ser aislados por técnicas convencionales de laboratorio (Schloss y Handelsman, 2003), limitando el estudio de las interacciones entre microorganismo y ambiente y el descubrimiento de especies nuevas y compuestos sintetizados como antibióticos y enzimas (Culligan *et al.* 2013). Esto ha hecho que se diseñen nuevas técnicas para poder identificar la microbiota presente en los distintos ambientes.

2.2 Técnicas para el análisis de las poblaciones microbianas

Debido a la limitación de los métodos tradicionales de cultivo, el análisis de comunidades microbianas se basa en técnicas para la extracción, cuantificación e identificación de moléculas del ambiente que son específicas de ciertos microorganismos o grupos de estos.

En este sentido, los estudios de poblaciones bacterianas se realizan principalmente con el estudio de perfiles de fosfolípidos, hibridación de sondas nucleotídicas específicas marcadas con un fluorocromo que interaccionan con el ADN ambiental, el análisis de

polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés) o la secuenciación nucleotídica (Hill *et al.* 2000). En estos, los análisis del perfil de fosfolípidos proveen una descripción cuantitativa de la comunidad microbiana en un ambiente (Frostegård *et al.* 2011) sin embargo la metodología posee la desventaja que puede ser afectado por el estado metabólico de las comunidades y por alteraciones en el ambiente (Willers *et al.* 2015). En el caso de los ácidos nucleicos, éstos proveen más información respecto a los organismos presentes en el ambiente (Hill *et al.* 2000).

2.3 Análisis de poblaciones bacterianas en base a secuencias nucleotídicas

La combinación de técnicas y metodologías de biología molecular asociadas con bioinformática para analizar las secuencias de ADN obtenidas en una muestra, ha permitido la identificación de microorganismos en muestras ambientales, haciendo con ello que sea posible el acceso a genes con funcionalidad única los cuales pueden ser clonados en cromosomas artificiales bacterianos (BAC por sus siglas en inglés) para el estudio de su transcripción y traducción (Myrold *et al.* 2013).

Para el estudio de poblaciones se utiliza el gen de la subunidad menor del ARN ribosomal 16S y 18S en procariotas y eucariotas respectivamente, como marcador filogenético. En este sentido el ARNr 16S representa un buen marcador filogenético debido a que está presente en casi en todo el reino Bacteria, existe como una familia mutagénica u operones, su función no ha cambiado con el paso del tiempo, siendo lo suficientemente largo (~1,550 pb; Clarridge 2004) para propósitos informáticos y evolutivos (Fig 1, Illumina 2012). Este ARNr forma parte de la subunidad menor 30S de los ribosomas bacterianos, esta secuencia se encuentra altamente conservada entre organismos de la misma especie, pero difiere entre organismos de otros géneros y especies (Woo *et al.* 2008).

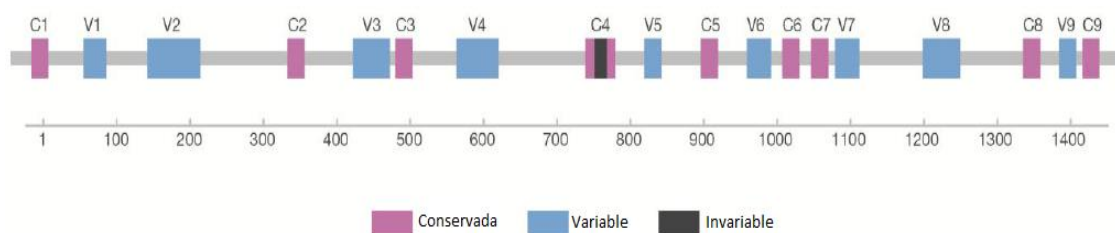


Fig. 1 Representación esquemática del gen del ARNr 16S. La localización variable (azul) y conservada (morado) en el ARNr 16S bacteriano. La región en gris es invariable en todas las bacterias (Illumina, 2012).

Esta estructura del gen de la subunidad 16S del ARNr ha permitido el diseño de técnicas que combinan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con RFLP (Spiegelman *et al.* 2005). Esta técnica a pesar de ser muy empleada cuenta con la desventaja de que los patrones de bandas obtenidos pueden ser muy parecidos entre especies dependiendo de las enzimas de restricción utilizadas (Kirk *et al.* 2004); además de que las muestras pueden presentar inhibidores de la PCR tales como sustancias húmicas, proteínas y lípidos (Law *et al.* 2014). Estas desventajas han hecho que las tecnologías de secuenciación tomen un gran papel en el estudio de poblaciones microbianas al poder elucidar a los microorganismos presentes en una muestra.

El principio de las tecnologías de secuenciación de última generación, es parecido al principio de la secuenciación de Sanger, a diferencia que éstas permiten la secuenciación de millones de fragmentos de manera paralela en una plataforma de lectura de secuencias de ADN disminuyendo el tiempo de secuenciación y el costo de esta (Park & Kim 2016).

Actualmente los sistemas de secuenciación Roche 454 e Illumina son los más empleados para análisis metagenómicos. Con el avance en las tecnologías se ha logrado identificar microorganismos difíciles de crecer en laboratorio logrando la caracterización de una gran parte de sus genomas y la identificación de genes nuevos que codifican para múltiples proteínas con funciones de interés dando lugar a la era de la metagenómica (Luo *et al.* 2011).

2.4 La metagenómica y la exploración de las poblaciones bacterianas

El metagenoma es definido como el conjunto de genes de todos los microorganismos presentes en el ambiente, su interacción entre sí y con el ambiente (Handelsman et al. 1998). La secuenciación y bioinformática ha dado acceso a la exploración de las comunidades bacterianas en todo tipo de muestra y como es que ellas pueden interactuar con el ambiente en diferentes regiones del mundo con condiciones extremas como altas temperaturas, pH extremos, y con alta concentración de sales, permitiendo el descubrimiento de múltiples microorganismos (Mirete et al. 2016). Derivado de esta tecnología, se han desarrollado proyectos que buscan identificar los microorganismos presentes como el proyecto del microbioma de la tierra (Earth Microbiome Project, Gilbert et al. 2014), el proyecto del microbioma humano (Turnbaugh et al. 2007), y el proyecto Sorcerer II para estudio del microbioma marino (Rush et al. 2007).

El microbioma de suelo es altamente diverso, un gramo de suelo puede contener más de 10 billones de microorganismos y más de mil especies diferentes (Delmont *et al.* 2011). El proyecto del microbioma de la tierra (Earth Microbiome Project, Gilbert, 2014) abarca el análisis de múltiples microorganismos y bacterias benéficas presentes en la rizosfera (debajo del suelo), la filosfera (encima del suelo) y sus efectos en las plantas (Berlec, 2012), el efecto de procesos de desinfección en la población bacteriana en plantas purificadoras de agua (Gomez-Alvarez *et al.* 2012), así como estudios en glaciares, presentado una gran variedad microbiológica a pesar de ser considerado un ambiente con poblaciones muy reducidas (Choudhari, 2014).

Dentro de los estudios enfocados en determinar la biodiversidad bacteriana, en ríos contaminados con desechos ácidos de minería se detectaron principalmente los filos *Proteobacteria*, *Nitrospirae*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Acidobacteria* (Méndez-García *et al.* 2015), en mares y océanos los géneros de *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, *Pelagibacter* y *Burkholderia* encontrados en la mayoría de las muestras tomadas a través del Atlántico norte hasta el canal de Panamá (Rush *et al.* 2007). Estos estudios han acelerado el descubrimiento de nuevas especies llevado a la expansión del árbol filogenético de las bacterias de 12 filos descritos por Woese hasta más de 70 filos

con su genoma parcial o completamente secuenciado (Eloe-Fadrosh *et al.* 2015), permitiendo describir proteínas como lipasas alcalinas, esterasas, lactonasas, genes de resistencia a antibióticos, antimicrobianos, entre otras (Guazzaroni *et al.* 2010).

La metagenómica ha sido empleada también en la biorremediación, al permitir la identificación de poblaciones bacterianas que pueden degradar o remover desechos industriales, hidrocarburos de suelo y agua o ser usados como biosensores para la detección de contaminantes (Bramucci y Nagarajan 2006). En este sentido, Peng y colaboradores (2015) realizaron estudios de suelos contaminados con petróleo en China, encontrando que dichos suelos presentaban una mayor diversidad de especies en comparación con los controles libres de contaminantes, estando en mayor presencia los grupos *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, siendo degradadoras de hidrocarburos; así como la presencia de *Phenylobacterium*, descrita con la funcionalidad de degradar ácido sulfúrico alquinobenzeno.

2.5 Incorporación de la secuenciación en la inocuidad alimentaria

Los microorganismos juegan un papel importante en la producción de alimentos a lo largo del proceso de producción. La reducción de costos y el avance en las tecnologías de secuenciación ha permitido que la metagenómica se adapte para el control de calidad y de la inocuidad en alimentos (Alkema *et al.* 2016).

El estudio de las poblaciones microbianas en los alimentos ha sido de interés para identificar la microbiota nativa de un alimento, las alteraciones que esta puede sufrir en el procesamiento de los alimentos y el efecto de los conservadores sobre estas. Bokulich y Mills (2013), reportaron que la microbiota presente en las superficies del área de procesamiento puede transferirse a los quesos artesanales, por lo que la presencia de microorganismos deteriorantes en el ambiente directo de las líneas de procesamiento incrementan la probabilidad de contaminación del producto final. En este sentido, Anvarian y colaboradores (2016), secuenciaron el microbioma de las áreas de bajo, medio y alto grado de limpieza de una empresa productora de fórmulas para infantes,

mostrando como la dinámica del procesamiento, temperatura y fluctuaciones temporales en el ambiente de producción influyen en las poblaciones bacterianas del producto.

Además del estudio de la interacción de productos con microorganismos del ambiente en donde se producen, varias investigaciones se han enfocado en encontrar las bacterias clave en los procesos de fermentación, el análisis de la microbiota de los productos fermentados abarca la mayoría de los estudios metagenómicos realizados en alimentos (Cao *et al.* 2017). La implementación de la secuenciación del ARNr 16S en estos productos ha permitido identificar las poblaciones bacterianas que forman parte de productos como el kéfir, presentando especies del género *Lactobacillus* como *L. kefiranofaciens*, *L. buchneri* y *L. helveticus* (Nalbantoglu *et al.* 2014); en el kimchi, dominado por bacterias del género *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Weissella* (Jung *et al.* 2011).

La gran mayoría de los estudios de las poblaciones bacterianas en alimentos se han enfocado en productos fermentados. Los productos frescos como frutas y vegetales han sido de poco interés para el análisis de poblaciones bacterianas, considerando que estos son uno de los principales causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs; Marti *et al.* 2013)

2.6 Estudio de poblaciones bacterianas en productos vegetales

El consumo de frutas y verduras representa una ruta de exposición directa a bacterias presentes en el suelo, causando múltiples brotes de ETAs, siendo productos como el tomate, chile, zanahoria y lechuga los más afectados debido a que se consumen principalmente crudos (Marti *et al.* 2013). Estos pueden presentar cortes en su epitelio que permite que los microorganismos se alberguen dentro de ellos o poseen una cáscara que facilita el encapsulamiento de patógenos, tal es el caso del melón (Richards y Beuchat, 2004)

Las tecnologías de secuenciación han adquirido importancia en la detección y tipificado de patógenos en productos vegetales frescos para la investigación y monitoreo de brotes

causados por el consumo de frutas y vegetales (Sekse 2017). En este aspecto, se ha implementado para la detección y descripción de taxones de *Salmonella* en muestras de tomates, así como cambios de la microbiota al pasar de un pre-enriquecimiento a un post-enriquecimiento para *Salmonella*, observando un cambio en la microbiota nativa, dominada por *Proteobacterias* a *Firmicutes* después de 24h de enriquecimiento (Ottesen *et al.* 2013). Dicho cambio también fue observado en cilantro (Jarvis *et al.* 2015).

De la misma manera, se han realizado estudios de secuenciación de genes marcadores para la detección de *Escherichia coli* productora de Shiga-toxinas (STEC) en espinacas inoculadas para la detección del patógeno, determinar la cepa e identificar los genes de virulencia clave, además de estudiar los cambios de la microbiota nativa de las espinacas y como ésta se veía alterada con diferentes condiciones de enriquecimiento para STEC (Leonard *et al.* 2015).

Los métodos basados en secuenciación han permitido identificar como la microbiota de la filosfera puede ser afectada por las estaciones, irrigación, tipo de suelos, entre otros parámetros en lechugas inoculadas con *E. coli* O157:H7, en donde el filo *Firmicutes* se encontraba mayoritariamente en inicios de la temporada (Junio) de cosecha y *Proteobacteria* que comprendía la mayoría de las bacterias recuperadas a finales de la temporada (Agosto y Octubre) demostrando que las poblaciones bacterianas variaban dependiendo de la época del año y por el tipo de riego que se utilizaba (Williams *et al.* 2013).

2.7 El melón como un foco de problemas en inocuidad alimentaria

El melón es una planta anual herbácea monoica de la familia *Cucurbitaceae*. Es de tallo rastrero y su fruto pepónide presenta un gran contenido de agua con un sabor dulce. Se encuentra primordialmente en zonas con climas tropicales y secos, requiriendo suelos arenosos ricos en materia orgánica y aeración (CONABIO, 2011).

México se encuentra en el segundo lugar en exportación de melón a nivel mundial llegando a alcanzar una producción de 603 mil toneladas al año (SAGARPA, 2016).

Este producto ha sido históricamente de interés para la salud pública debido a que se ha asociado como responsable de brotes de ETAs. Esto en parte se debe a las características propias de este fruto, como es la corteza rugosa con forma de red que sirve de refugio a los microorganismos, haciendo que el proceso de lavado y desinfección no sea siempre efectivo (Quezada *et al.* 2008).

Un ambiente de pre-cosecha, el suelo, abono empleado, irrigación con agua contaminada, presencia de animales y fallas en la higiene de los trabajadores pueden ser vectores potenciales de contaminación en melón. Se han reportado brotes por *Salmonella enterica*, *C. jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7 y Norovirus en los Estados Unidos en donde el vehículo de los patógenos ha sido el melón (Bowen *et al.* 2006).

Se ha visto que microorganismos como *L. monocytogenes* pueden sobrevivir en el suelo por más de 8 semanas, en tanto que *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 pueden hacerlo hasta por 23 y algunos virus pueden estar presentes hasta por 3 semanas (Bowen *et al.* 2006).

Ha habido un incremento de ETAs asociadas al consumo de melón y otros productos frescos. Se han reportado múltiples brotes de listeriosis relacionados al melón, causando síntomas como dolor de cabeza, pérdida del equilibrio, confusión, convulsiones y fiebre (CDC, 2017), como en el año 2003 en el cual la contaminación ocurrió durante el cortado del melón en establecimientos comerciales en Estados Unidos (Varma *et al.* 2007). Posteriormente en el 2011 melones contaminados con *L. monocytogenes*, llevaron a enfermarse a 147 personas, causando 33 muertes (CDC, 2012).

En cuanto a brotes causados por otros patógenos asociados a consumo de melón, podemos mencionar, en Estados Unidos un brote por *E. coli* O157: H7 en el 2008 causado por contaminación cruzada entre carne molida y melón, enfermando a 5 personas a quienes causó síntomas de diarrea, colitis hemorrágica, y complicaciones graves como el síndrome urémico hemolítico (HUS por sus siglas en inglés; CDC, 2016). En el caso de *Salmonella* como responsable de brotes por consumo de melón, en 2012 se reportó un brote de *Salmonella* Typhimurium y Newport en Estados Unidos enfermando 261 personas, causando síntomas de diarrea, fiebre, dolor abdominal(CDC,2013).

En cuanto al microbioma propio del melón, puede ser modificado durante la cadena de producción debido a un sinnúmero de factores, entre los cuales su localización, ya que se encuentra en contacto con sistemas de riego, agricultores, animales y maquinaria. Durante el proceso de recolección se realiza la limpieza superficial del melón, removiendo partículas de tierra, siendo también un proceso crítico para su contaminación; ya que cuando este proceso se realiza por lavado con agua fría se permite que patógenos como *Salmonella* y enterobacterias puedan alojarse dentro de la cascara y las cicatrices del tallo del melón (Richards y Beuchat, 2004). Durante ese proceso también se pueden añadir microorganismos patógenos que pueden ser un peligro para el consumidor.

El uso de las técnicas de última generación de secuenciación implementadas en aspectos de inocuidad alimentaria ha permitido identificar a los microorganismos nativos y poder detectar contaminación con patógenos durante el proceso de producción (Ercolini, 2013) por lo que su implementación es necesaria para tener un mejor control en la inocuidad en la producción melón y otros productos que se consumen principalmente frescos.

3. JUSTIFICACIÓN

Los avances en las tecnologías de secuenciación han permitido que los estudios de la población microbiana sean más económicos y rápidos, con mejor capacidad de detectar las bacterias presentes en una muestra ambiental y poder identificar cuáles son predominantes en la población.

Esto ha abierto las puertas a la implementación de la metagenómica en sistemas de inocuidad para la detección de poblaciones microbianas que no siempre pueden ser detectadas por métodos tradicionales de microbiología. La identificación de poblaciones bacterias en alimentos se encuentra principalmente enfocada a alimentos fermentados, por lo que productos frescos que son responsables de gran cantidad de casos ocasionados por microorganismos patógenos, como el caso del melón, se encuentran poco estudiado.

Conocer la distribución de las poblaciones bacterianas con las que interactúa el melón estando en el campo es importante para entender como estas participan y pueden influir en su crecimiento. Por lo que este estudio tuvo como finalidad el describir las poblaciones bacterianas en el ambiente de producción de melón en campo. Este permitirá conocer las poblaciones bacterianas y determinar si existe una relación entre los microorganismos presentes entre los diversos puntos que pueden estar en contacto con el fruto.

4. HIPÓTESIS

Existe una relación entre la población bacteriana del melón en campo, con la flora encontrada en suelo de cultivo y manos de los pizcadores.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

Objetivo General

- Establecer las poblaciones bacterianas presentes en muestras de suelo, melón y manos de pizcadores, en el campo.

Objetivos Específicos

- Determinar las poblaciones bacterianas presentes en muestras de suelo, melón y manos de pizcadores en base a las secuencias de RNAr 16S presentes..
- Comparar las poblaciones bacterianas presentes en suelo, fruto y manos de los pizcadores en las huertas de melón analizadas.
- Determinar filos bacterianos potencialmente patógenos en las muestras analizadas.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 Recolección de muestras

Las muestras de lavados de melón (*Cucumis melo* var. *Cantalupensis*), lavados de pizcadores y tierra fueron recolectadas de dos huertas [A (25.7497655, -102.2532605) y B (25.6288922, -101.8247441)] ubicadas en la región de Paila, Coahuila los días 6 y 20 de Junio y 5 de Julio del 2017. Las muestras fueron recolectadas acorde a la metodología descrita por Heredia *et al.* (2016) que se describe posteriormente con algunas modificaciones. Un total de 12 muestras de suelo, 69 muestras compuestas de melón y 41 muestras de lavados de pizcadores fueron colectadas a lo largo de las 3 visitas a las huertas.

6.2 Muestreo de lavado de melones

Se muestrearon de 414 melones, que correspondieron a 69 muestras compuestas, ya que cada una de estas se componía de 6 melones para lograr mayor cantidad de biomasa.

En el campo se colectaron dos melones los cuales fueron lavados con 500ml de agua peptonada (AP) al 0.15% (p/v) en bolsas Whirl-Pak (55 oz Nasco, Fort Atkinson, WI). Las bolsas fueron agitadas manualmente por 30 s, masajeados los melones desde el exterior de la bolsa por otros 30 s y un segundo proceso de agitación por 30 s. Esto se realizó con 3 bolsas diferentes teniendo un total de enjuagues de 6 melones, los cuales fueron mezclados para obtener una muestra compuesta de 1500 ml. En cada visita se colectaron 12 muestras compuestas. Las muestras fueron colocadas en hieleras y transportadas al laboratorio para su posterior procesamiento.

6.3 Muestreo de lavado de manos

Se obtuvieron las muestras de lavado de manos después de obtener de manera oral el consentimiento informado de las personas. Los trabajadores colocaron primero una mano adentro de una bolsa con 750 ml de AP, se le pidió que la agitara por 30 s, seguido de un masaje por fuera de la bolsa 30 s adicionales. El procedimiento se repitió con la otra mano para obtener 10 muestras por visita. Las muestras fueron colocadas en hieleras y transportadas al laboratorio para su posterior procesamiento.

6.4 Muestreo y caracterización del suelo

Con cucharas pre-esterilizadas se tomó muestra de suelo que circundaba al melón que se colectó previamente, se seleccionaron puntos al azar en donde se escarbó 10 cm por debajo de la superficie y se colectó aproximadamente 50 g de suelo colocándolo dentro de una bolsa, obteniendo un total de 12 bolsas. Las muestras fueron colocadas en hieleras y transportadas al laboratorio para su posterior procesamiento. Se determinó la textura de suelo utilizando la metodología descrita por Thien (1979) y la medición de pH por la metodología descrita por la secretaria de desarrollo urbano y ecología (1992), las cuales se describen brevemente a continuación.

Para la identificación del suelo en base a su textura se tomaron 5 gr de suelo el cual fue humedecido con agua bidestilada, después la muestra de suelo fue clasificada en base a su textura.

Para la medición del pH, se tomaron 10 g de suelo y se mezcló con 90ml de agua bidestilada y se colocaron en un agitador orbital MaxQ 4450 (Thermo Fisher) a 100 rpm por 10 min y dejando reposar 30 min. Luego se realizó la medición del pH utilizando un potenciómetro HANNA modelo pH 211 (Sigma-Aldrich).

6.5 Extracción de ADN

De las muestras compuestas de lavados de melones y de los de manos se tomaron 20 ml de cada una y se filtraron a través de una membrana de esteres mixtos de celulosa de 0.45 μm de poro (Millipore) con la ayuda de un equipo de filtración al vacío. Posteriormente la membrana fue cortada a la mitad, una mitad se colocó dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se procedió a la extracción de ADN mediante el kit de extracción DNAeasy Blood & Tissue (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez extraído el ADN se tomaron alícuotas de 5 μl de cada muestra los cuales se mezclaron en un tubo Eppendorf de 200 μl obteniendo un total de 6 muestras de ADN de lavados de melón y 6 de lavados de manos.

Para el caso de las muestras de suelo, la extracción de ADN se realizó según la metodología descrita por Junttila *et al.* (2009) con algunas modificaciones. Un gramo de suelo se colocó en un tubo Falcon cónico de 12 ml estéril, al cual se le adicionaron 3 ml de amortiguador NTES [10mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.1M NaCl, 1mM EDTA y SDS al 1% (p/v)] estéril. Posteriormente las muestras se colocaron en un sonicador Branson 2510 Ultrasonic Cleaner (Marshall Scientific) a una frecuencia de 40Hz por 30 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 4,000 rpm por 10 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se realizó una extracción de ADN siguiendo la metodología de extracción de Fenol- Cloroformo - Isoamílico (25:24:1) descrita por Griffiths y colaboradores (2000) y el ADN fue precipitado con alcohol etílico al 96%. El ADN fue diluido en amortiguador TE 1X (10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA). La pureza y cantidad del ADN fue determinado con un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Fisher).

Para formar una muestra compuesta que fuera representativa de cada huerta, se tomaron 5 μl de cada muestra y se mezclaron en un tubo Eppendorf de 200 μl , obteniendo 4 muestras de ADN proveniente de suelo para realizar su secuenciación.

6.6 Secuenciación

Las muestras que fueron enviadas a secuenciar se identificaron de la siguiente manera:

Muestra-Huerta Muestreo

En donde:

Muestra: indicó el tipo de muestra (lavado de manos, lavado de melón, suelos)

Huerta; indicó la huerta de donde procedía la muestra (huerta A y B)

Muestreo: indicó la visita al cual la muestra pertenecía (visita 1, 2 o 3)

La secuenciación fue realizada por la compañía de secuenciación MR DNA (Shallowater, TX, USA). Los oligonucleótidos específicos para la región variable V4 del gen 16S ARNr fueron 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3') con códigos de barra específicos para cada muestra (Tabla 1) en una PCR de 28 ciclos usando el HotStarTaq Plus Master kit (Qiagen, USA) bajo las siguientes condiciones: Inicio de 94 °C por 3 min, seguido de 28 ciclos de 94 °C, 53 °C por 4 s y 72 °C por 1 min y una elongación final a 72 °C por 5 min. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 2% para determinar el éxito de la amplificación y la abundancia relativa de las bandas. Las muestras fueron mezcladas equitativamente y purificadas usando perlas Ampure XP. Posteriormente las muestras fueron secuenciadas en un equipo MiSeq (Illumina, CA, USA).

Las lecturas crudas (sin modificación, Raw data) fueron separadas por muestras utilizando el software Fastq processor (Mr. DNA). Posteriormente las lecturas 1 (Forward) y 2 (Reverse) de cada muestra fueron unidas con su lectura homóloga, procesadas y analizadas utilizando el software gratuito QIIME2 (<https://qiime2.org/>).

Tabla 1 Códigos de barra para la identificación de las lecturas de cada muestra.

Muestra	Código de Barras
Manos-A 1	GAGTGACA
Manos-A 2	GAGTGAGT
Manos-A 3	GAGTGTCT
Manos-B 1	GAGTACAG
Manos-B 2	GAGTACTC
Manos-B 3	GAGTAGAC
Melón-A 1	GAGTCAGA
Melón-A 2	GAGTCTCA
Melón-A 3	GAGTCTGT
Melón-B 1	GAGATCTC
Melón-B 2	GAGATGAC
Melón-B 3	GAGATGTG
Suelo-A 2	GAGTCACT
Suelo-A 3	GAGTAGTG
Suelo-B 2	GAGATCAG
Suelo-B 3	GAGAGTGT

6.7 Procesamiento de las lecturas

Se obtuvo un total de 1,194,765 lecturas de las 16 muestras (Tabla 2). Estas fueron importadas a QIIME2. Posteriormente, se realizaron cortes eliminando 20 nucleótidos en el extremo 5', así como truncando las lecturas en los nucleótidos 242 (Forward) y 241 (Reverse) de todas las lecturas. Posteriormente, las lecturas fueron unidas con sus secuencias homologas utilizando la función DADA2 denoise en QIIME 2 para formar secuencias de un tamaño de 240-400 bases, las secuencias que no presentaron una secuencia homóloga para unirse (conocidas como singletons), secuencias erróneas

creadas por el proceso de PCR (quimeras) fueron descartadas. Las lecturas unidas se usaron para formar secuencias consenso para formar las unidades taxonómicas operacionales (OTUs, por sus siglas en inglés y conocidas como “features” en QIIME2) utilizando la función DADA2, obteniendo una tabla de frecuencia de estos OTUs y secuencias representativas, las cuales fueron utilizadas para la construcción de árboles filogenéticos y la clasificación taxonómica.

Tabla 2 Conteo de lecturas obtenidas en cada una de las muestras tras la secuenciación y el conteo de lecturas que quedaron tras procesar las muestras.

Nombre de la Muestra	Conteo de Lecturas crudas	Conteo de Lecturas después del Procesamiento
Manos-A 1	75,072	62,204
Manos-A 2	73,145	58,412
Manos-A 3	131,114	102,382
Manos-B 1	67,772	55,728
Manos-B 2	86,983	64,903
Manos-B 3	79,887	59,115
Melón-A 1	69,329	52,174
Melón-A 2	74,915	57,194
Melón-A 3	68,291	50,788
Melón-B 1	69,385	54,648
Melón-B 2	71,904	56,408
Melón-B 3	70,007	53,189
Suelo-A 2	55,928	37,186
Suelo-A 3	51,325	46,388
Suelo-B 2	73,866	48,770
Suelo-B 3	75,872	68,777
Total	1,194,765	928,266

6.8 Análisis de las lecturas

Las lecturas fueron alineadas usando la función de alineamiento de secuencias nucleotídicas MAFFT en QIIME 2, se creó un árbol filogenético para los análisis de diversidad filogenética de las secuencias el cual se utilizó para los análisis de diversidad alfa (riqueza de especies y distribución de especies por muestra) y beta (diferencia entre la riqueza y distribución de las especies entre muestras) utilizando la extensión de q2-phylogeny en QIIME2.

Para los análisis de diversidad, se seleccionaron 36,000 secuencias al azar por muestra (siendo este número cercano al total de las secuencias presentes en la muestra con menor cantidad de lecturas) y se analizaron en QIIME2 con la función de análisis filogenéticos y métricas de biodiversidad “core-metric-phylogenetic” utilizando los parámetros estándares para la obtención de métricas de α (OTUs, diversidad filogenética y distribución) para crear gráficos de cajas. Aunado a esto, se realizaron gráficas de análisis de coordenadas principales (PCoA por sus siglas en ingles), lo que nos permitió realizar una comparación entre la similitud, diferencias en tipo y cantidad de lecturas en las muestras utilizando las métricas de β diversidad

6.9 Clasificación taxonómica de las especies

Se realizó la clasificación taxonómica de los OTUS utilizando la base de datos SILVA128 (Quast *et al.* 2013) compuesta por 1,922,213 secuencias únicas reportadas del gen ARNr 16S de diferentes bacterias como referencia. Las secuencias que no se lograron clasificar fueron extraídas y se compararon contra la base de datos del NCBI (Altschul *et al.* 1990), utilizando la herramienta nt-BLAST con la siguiente especificación de búsqueda, retirando las secuencias no-cultivables (NOT uncultured), no ambientales (NOT environmental), sin clasificar (NOT classified) y con un filtro entre 200 a 3000 pb. Se realizó la remoción de las secuencias clasificadas de mitocondrias y cloroplastos.

Se crearon mapas de calor (heatmaps) para realizar una comparación entre las taxas más abundantes de las muestras. Se analizaron las 30 taxas con mayor frecuencia a nivel de clase, orden, familia y genero utilizando un método de agrupamiento de promedio y una métrica euclidiana de distancia en QIIME2.

6.10 Análisis estadístico

Las diferencias de los índices de alfa diversidad de OTUs observados, uniformidad (Pielou's evenness) y diversidad filogenética de Faith (Faith-pd), se analizaron utilizando diagramas de caja y usando la prueba estadística Kruskal-Wallis H en pares. Para los análisis de beta diversidad usando los métodos Jaccard y Bray-Curtis, usando un análisis de coordenadas principales (PCoA por sus siglas en ingles) en QIIME2.

7. RESULTADOS

7.1 Condiciones del ambiente

Para los estudios metagenómicos se tomaron 69 muestras compuestas provenientes de melón (*Cucumis melo* L), 41 de manos de pizcadores, 12 de muestras de suelo, obtenidas de dos huertas de melón en la región de Paila, Coahuila de Zaragoza, México durante la primavera-verano del año 2017.

La región del muestreo presenta una temperatura promedio de 18 °C mínima y 34 °C máxima en época de cosecha y recolección de melones. Las huertas A y B poseen diferencias en características físicas del suelo, aunque con pH similares (Tabla 3).

Tabla 3. Coordenadas, tipo de suelo, pH y numero de muestra para cada una de las huertas de melón.

Huerta	Ubicación de la huerta (Coordenadas)	Color y Textura	pH	Visita	Número de muestras		
					compuestas de Melón	Manos	Tierra
A	25.6288922,- 101.8247441	Grisáceo, Arcillosa	7.83	1	12	7	0
				2	12	6	3
				3	12	7	3
B	25.7497653, - 102.2532605	Café, Arenosa	7.74	1	11	7	0
				2	11	7	3
				3	11	7	3

Visita 1: 06 de Junio, Visita 2: 20 junio; Visita 3: 5 julio.

7.2 Análisis de las lecturas y conteo de OTUs

Se analizó la biodiversidad de las poblaciones bacterianas presentes en las muestras utilizando una curva de rarefacción. La Fig. 2 muestra los OTUs (Unidades taxonómicas) presentes en cada muestra en donde se observó que en toda las muestras hay una estabilización de las líneas, lo que nos indicó que la secuenciación abarcó todas las especies bacterianas presentes.

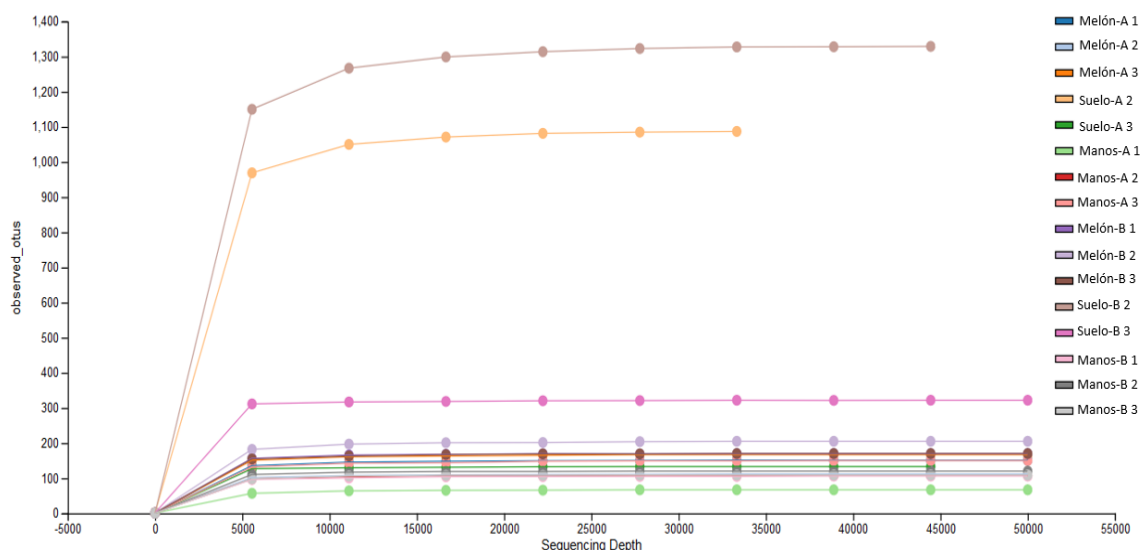


Fig. 2 Gráfica de refracción de los OTUs observados en las diferentes muestras con un muestreo aleatorio de lecturas de 50,000.

Un total de 2,777 OTUs únicas fueron creadas a partir de las lecturas de la secuenciación, siguiendo el procesamiento descrito previamente en metodología. Las muestras de suelo presentaron entre 130 a 1329 unidades taxonómicas, las de melón entre 112 a 205 y las muestras de manos entre 67 a 151. Las muestras de suelo presentaron una riqueza mayor en especies únicas en comparación a las muestras de manos y de melón; estas dos últimas presentan una biodiversidad similar (Tabla 4).

Tabla 4 Unidades taxonómicas operaciones creadas en cada una de las muestras.

Muestra	Unidades Taxonómicas Operaciones Presentes
Melón-A 3	167
Melón-A 1	151
Melón-A 2	112
Suelo-A 2	1087
Suelo-A 3	133
Manos-A 3	151
Manos-A 2	108
Manos-A 1	67
Melón-B 2	205
Melón-B 1	170
Melón-B 3	170
Suelo-B 2	1329
Suelo-B 3	322
Manos-B 2	120
Manos-B 3	109
Manos-B 1	106

7.3 Análisis de alfa diversidad

7.3.1 Análisis de diversidad filogenética

Los análisis de α diversidad, comparan métricas de biodiversidad que consisten en la determinación del índice de biodiversidad de Faith para saber qué tan diversas son las poblaciones presentes en las muestras y el índice de uniformidad de Pielou, para saber la similitud en la distribución de estas poblaciones. En nuestro caso el análisis de biodiversidad α se realizó utilizando el índice de Faith para la diversidad en las huertas, así como para los melones y manos de trabajadores por huerta (Fig. 3, Faith y Baker, 2006).

Los resultados del análisis mostraron que no existe una diferencia significativa (Kruskal-Wallis: $H= 0.17$, $p= 0.67$) en la biodiversidad filogenética entre las dos huertas (Fig. 3 a), siendo corroborado por el análisis estadístico entre pares (Tabla 7, anexo 1).

La biodiversidad filogenética entre los tres tipos de muestras (Fig. 3 b) mostraron que no hay diferencia significativa entre las muestras (Kruskal-Wallis: 12.72 , $p: 0.0017$, Tabla 8, anexo 1).

Por último, aunque la biodiversidad de las muestras separadas por cada una de las huertas (Fig. 3 c) mostró que la diversidad filogenética entre las muestras de manos, melón y suelo de la huerta A tienen un índice similar a las muestras de la huerta B. De la misma manera, las muestras de suelo de ambas huertas presentaron mayor biodiversidad, en comparación con las muestras de melón y manos, indicando que no existía diferencia significativa entre las muestras (Tabla 9, anexo 1).

Lo anterior sugiere que las muestras de suelo presentan una mayor biodiversidad, mientras que la biodiversidad de las manos y melón son similares, no existiendo diferencia entre las huertas.

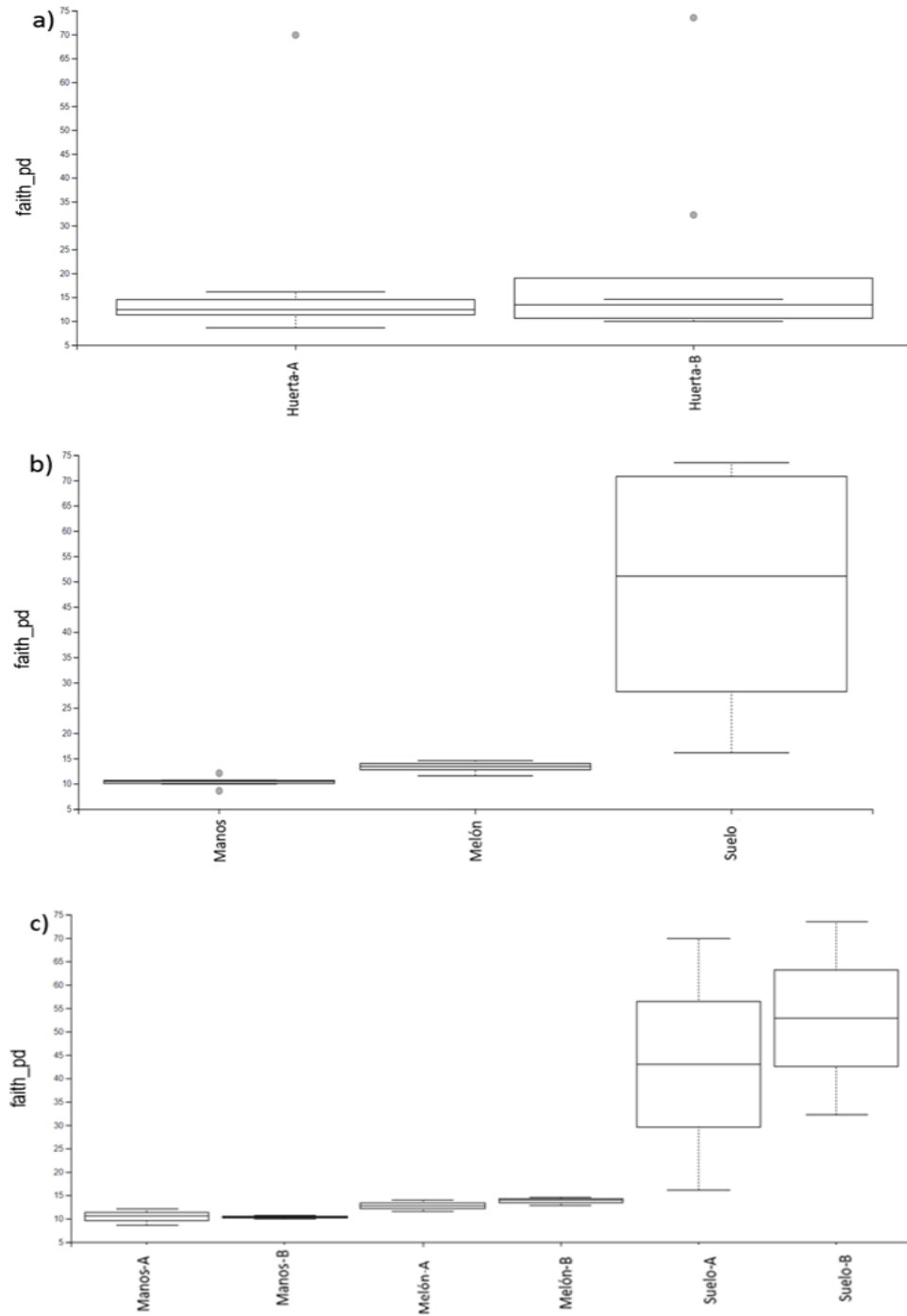


Fig. 3 Diagramas de cajas del índice de diversidad filogenética de las tres visitas de las huertas A y B. a) Índice de diversidad filogenética de las huertas. b) índice de diversidad filogenética del tipo de muestra, c) índice de diversidad filogenética de las muestras separadas por tipo de muestras y huerta de procedencia.

7.3.2 Índice de uniformidad

Posteriormente se realizó un análisis de uniformidad utilizando el índice de Pielou, analizando la distribución de las especies en el ambiente, en las muestras de melón, manos y suelo. Los análisis indicaron que no existían diferencias significativas (Kruskal-Wallis: $H= 2.8$, $p= 0.09$) entre la uniformidad de especies entre las huertas A y B (Fig. 4 a), lo cual fue corroborado por los análisis estadísticos entre pares (Tabla 10, anexo 1).

Los análisis entre los tipos de muestra, indicaron que el índice de Pielou entre manos y melón no presentaron diferencias significativas (Kruskal-Wallis: $H= 0.23$, $p= 0.63$) mientras que las muestras de suelo presentaron un mayor índice de uniformidad siendo estadísticamente diferente en comparación a las de manos y suelo (Kruskal-Wallis: $H= 6.5$, $p= 0.01$; Tabla 11, anexo 1), de igual manera se observó que comparando entre muestras separadas por su huerta de procedencia no se encontraron diferencias ($P<0.05$) en su uniformidad (Fig. 4 b y c; Tabla 12 anexo 1).

Este análisis indicó que las muestras de suelo presentaron mayor uniformidad, mientras que la uniformidad de las especies presentes en las muestras de las manos y melón fue similar, ni entre las dos huertas.

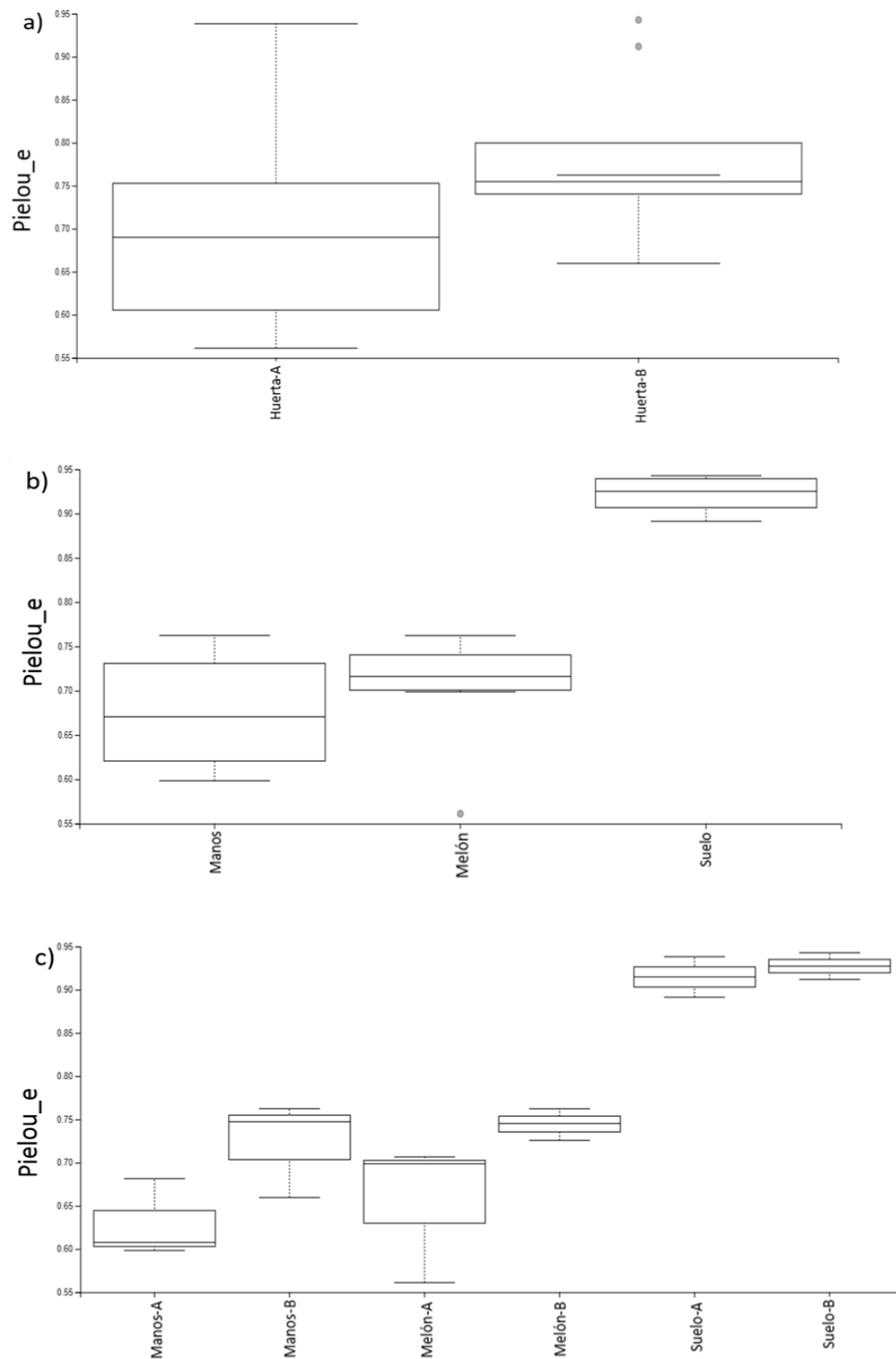


Fig. 4 Diagramas de cajas del índice de uniformidad de Pielou de las tres visitas de las huertas A y B a) Índice de igualdad de las huertas. b) índice de igualdad del tipo de muestra, c) índice de igualdad de las muestras separadas por tipo de muestra y huerta de procedencia.

7.4 Análisis de beta-diversidad

Los análisis de beta-diversidad permiten observar la similitud o diferencias entre las 16 muestras analizadas, utilizando los índices de Jaccard y Bray-Curtis, así como un análisis de coordenadas principal (PCoA por sus siglas en inglés).

Según el índice de similitud (Fig. 5 a) los resultados indicaron que las muestras de manos y melones, de los 3 muestreos, de las 2 huertas, se encontraban agrupadas, debido a la similitud que tienen en cantidad de OTUs y su biodiversidad. Se observó también que las muestras de suelo del tercer muestreo formaron una agrupación alejada de las del segundo debido quizá a la diferencia de OTUs de las muestras de suelo del segundo muestreo contra las del tercero (Tabla 4). Este patrón también pudo ser observado debido en el PCoA del índice diferencial de Bray-Curtis (fig. 5, b)

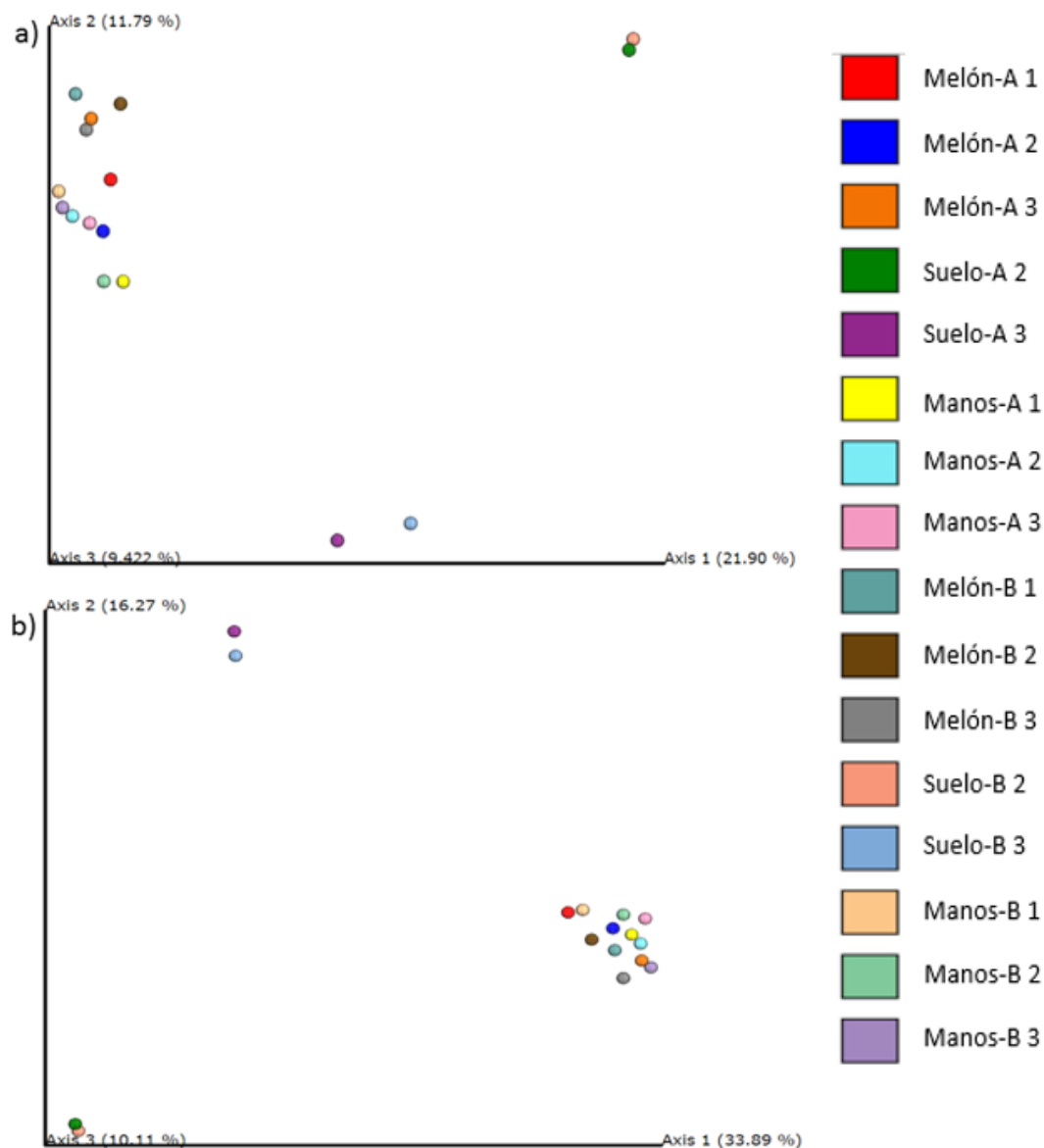


Fig. 5 Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las muestras de las tres visitas de las huertas A y B. a) PCoA del índice de Jaccard, b) PCoA del índice de Bray-Curtis.

7.5 Identificación de los microorganismos presentes en las muestras

Posterior al análisis de α y β diversidad, se realizó una clasificación filogenética. Las muestras se agruparon en secuencias representativas únicas creadas a partir de los OTUs, resultando un total de 2,777. Se descartaron 14 OTUs representativos al mostrar similitud con la secuencia del 18S de hongos y algas.

7.5.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica se realizó analizando todos los filos bacterianos presentes en las muestras (Fig. 6). Se encontraron 30 filos pertenecientes a los reinos de *Bacterias* y *Archeas*. Las 16 muestras secuenciadas presentaron como principales filos a las *Proteobacteria* (80-90%), *Firmicutes* (1-10%), y *Actinobacteria* (<1% en melón y manos, 10-20% en suelos).

La mayor diversidad de filos se presentó en muestras de suelo del segundo muestreo de ambas huertas encontrándose filos como *Eurarchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Woesearchaeota* y filos bacterianos como *Acidobacterias*, *Armatimonadetes*, *BRC*, *Candidatus Berkelbacteria*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Elusimicrobia*, *FBP* y *Parcubacteria*.

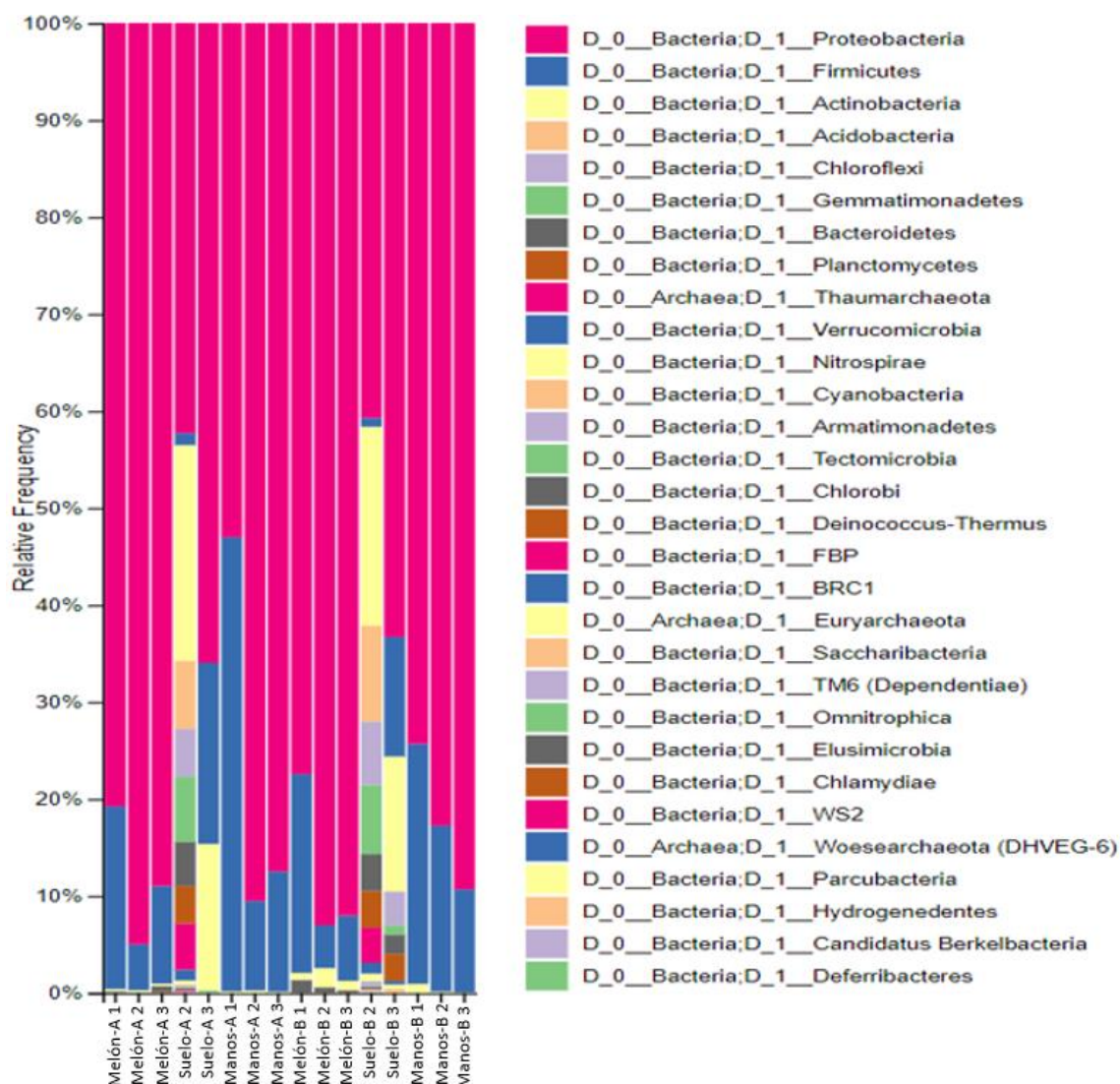


Fig. 6 Frecuencia relativa de los filos identificados en las lecturas de las muestras de melón, manos y suelo de las huertas A y B.

7.5.2 Mapas de calor de la abundancia relativa.

Debido a la gran cantidad de organismos únicos presentes, se diseñaron mapas de calor que abarcaron los 30 principales taxones a nivel de clases, órdenes y familias.

Los 2,777 OTUs fueron clasificados en 88 Clases, 180 Ordenes, 318 Familias y 578 Géneros. Este número se obtuvo debido a que el tamaño del fragmento del gen del ARNr 16S secuenciado (~250 bases) fue lo suficientemente grande para identificar a estos niveles taxonómicos, además que la base de datos SILVA128 abarca múltiples

microorganismos como taxones ambiguos. En aquellos casos en que su clasificación solo llegó hasta clases u órdenes, por lo que se describen como no cultivables (uncultured).

7.5.2.1 Clases

En el mapa de calor de las 30 principales clases que se muestra en la Fig. 7, se indica la presencia de *Gammaproteobacteria*, que abarcó hasta el 50% de las lecturas totales en todas las muestras, *Bacilli*, presentó una abundancia mayor de cantidad de lecturas en manos y melón, en tanto que *Betaproteobacteria*, fue más abundante en melón en comparación con manos y suelo; y *Actinobacteria* fue más abundante en suelo que en melón y manos; *Sphingobacteria* y *Clostridia* presentaron pocas lectura en las muestras de manos en comparación del suelo y el melón.

Así mismo se observaron clases presentes solamente en cierto tipo de muestras, como el caso de *TakashiAC-B11*, *Thermoleophilia*, *Gemmatinomadete* que estuvieron presentes únicamente en muestras de suelo.

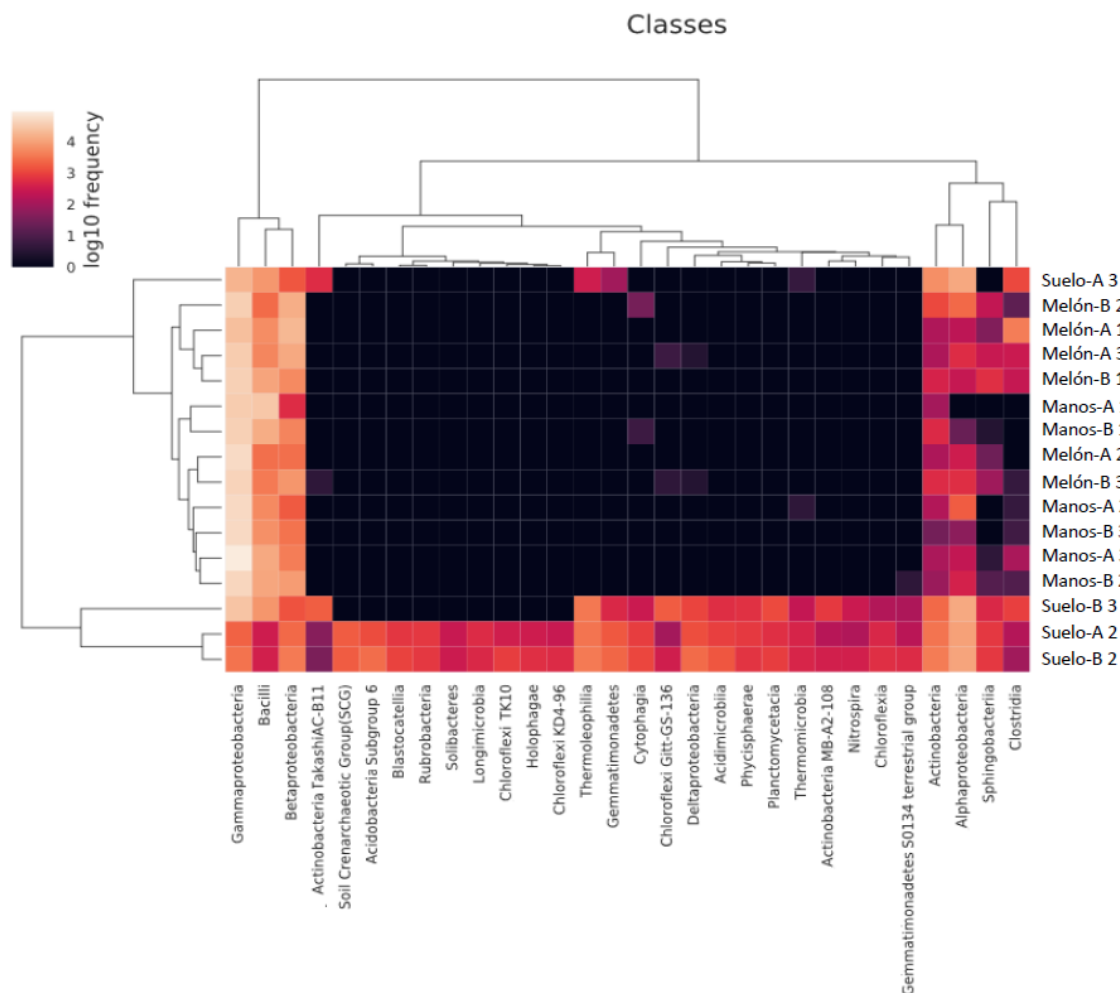


Fig. 7 Mapa de calor con las 30 clases más abundantes acomodado con un análisis jerárquico de conglomerados basado en las abundancias relativas en las muestras de suelo, melón y manos de las huertas A y B.

7.5.2.2 Orden

A nivel de orden, las taxas que se encontraron estuvieron distribuidas de manera uniforme entre las muestras incluyeron *Pseudomonadales*, *Bacillares*, *Enterobacterales*, *Burkholderiales*, *Xanthomonadales* y *Micrococcales* abarcando más de la mitad de las lecturas totales en todas las muestras; además que en la mayoría de las muestras se detectó presencia de *Lactobaciliares* excepto en las de suelo del segundo muestreo de ambas huertas. La muestra de suelo del segundo muestreo de ambas huertas

presentó elevada cantidad de lecturas de *Archeas* perteneciente a la clase de *Crenarcheotas* de suelo (Fig. 8).

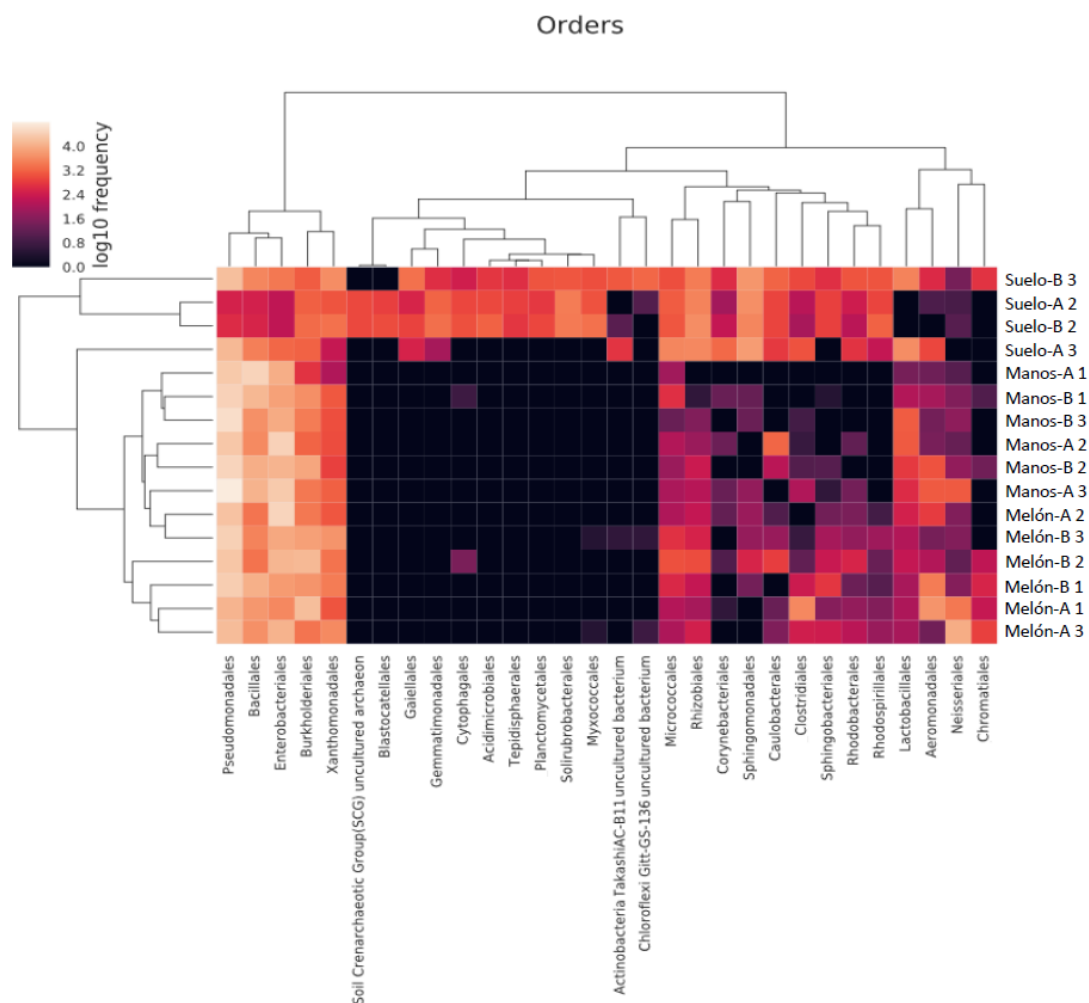


Fig. 8 Mapa de calor con las 30 ordenes más abundantes acomodado con un análisis jerárquico de conglomerados basado en las abundancias relativas en las muestras de suelo, melón y manos de las huertas A y B.

7.5.2.3 Familia

A nivel de familias, *Bacillaceae*, *Comamonadaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Xanthomonadaceae*, la Familia XII de *Bacilliales*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteraceae*, *Moraxelliaceae* y *Micrococcaceae* fueron encontrados en todas las muestras de las dos huertas abarcando hasta la mitad de las lecturas totales. Se observó

la presencia de especies de la familia de *Listeriaceae* en las muestras de Manos-B3 de la huerta B y Suelo-A1; y *Enterobacteriaceae* presente en todas las muestras, por lo que se deduce que pueden existir especies patógenas para el humano en este ambiente. Cabe mencionar que en todas las muestras encontramos familias que contienen especies fitopatógenas como el caso de *Xanthomonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Rhizobiaceae* (Fig. 9).

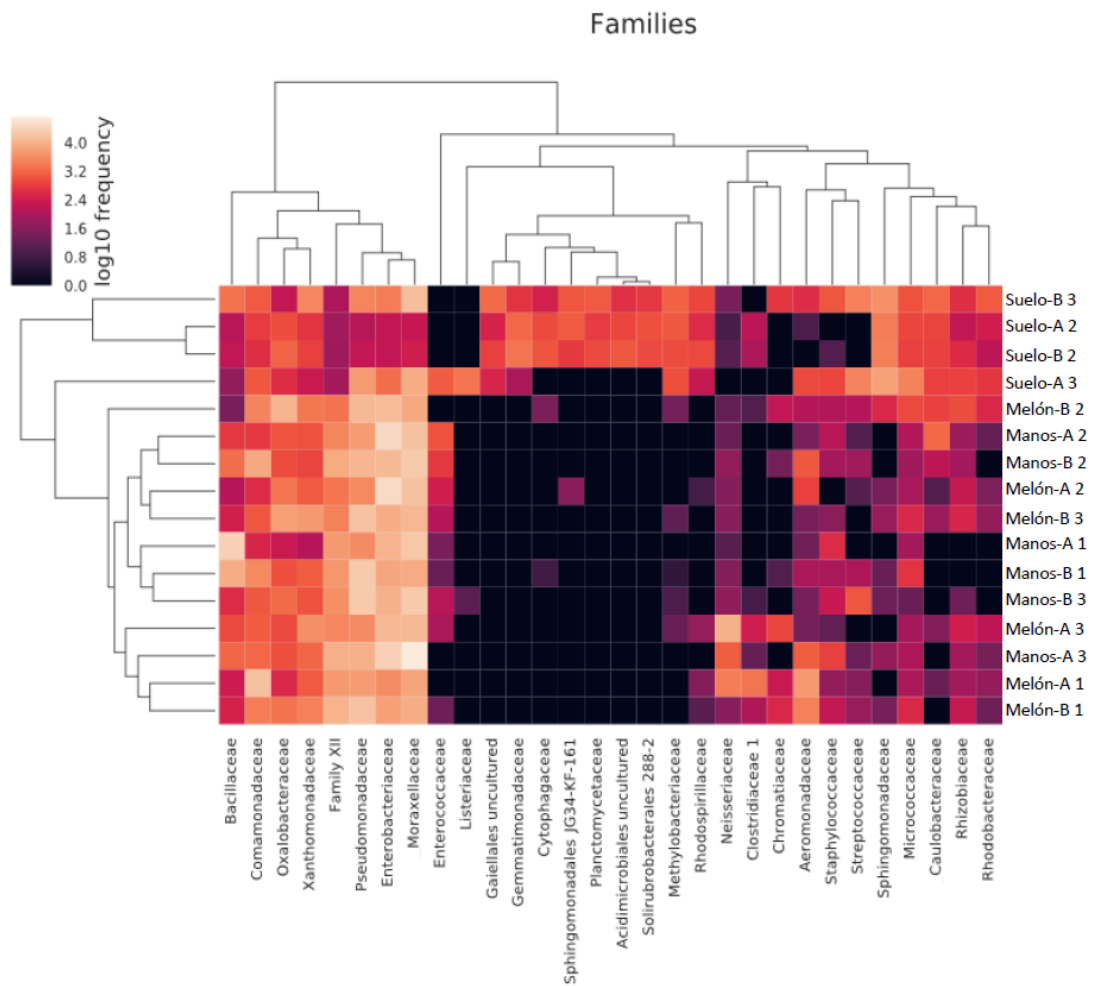


Fig. 9 Mapa de calor con las 30 familias más abundantes acomodado con un análisis jerárquico de conglomerados basado en las abundancias relativas en las muestras de suelo, melón y manos de las huertas A y B.

7.5.2.4 Género

El mapa de calor a nivel de género, permitió observar la presencia del *Bacillus*, *Acitenobacter*, *Staphylococcus*, *Exiguobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Delftia*, *Massilia*, *Pseudomonas*, *Erwinia* y *Rhizobium* en todas las muestras. Se logró identificar la presencia de géneros *per se* patógenos para el hombre como es el caso de *Salmonella* en manos y melones. En las muestras de suelo, de la huerta A, así como de manos de la huerta B del tercer muestreo se detectó la presencia de *Listeria* y *Escherichia*. También entre los géneros más abundantes se detectó a *Pseudomonas*, *Erwinia* y *Rhizobium*, los cuales presentaron especies clasificadas como fitopatógenas (Fig. 10).

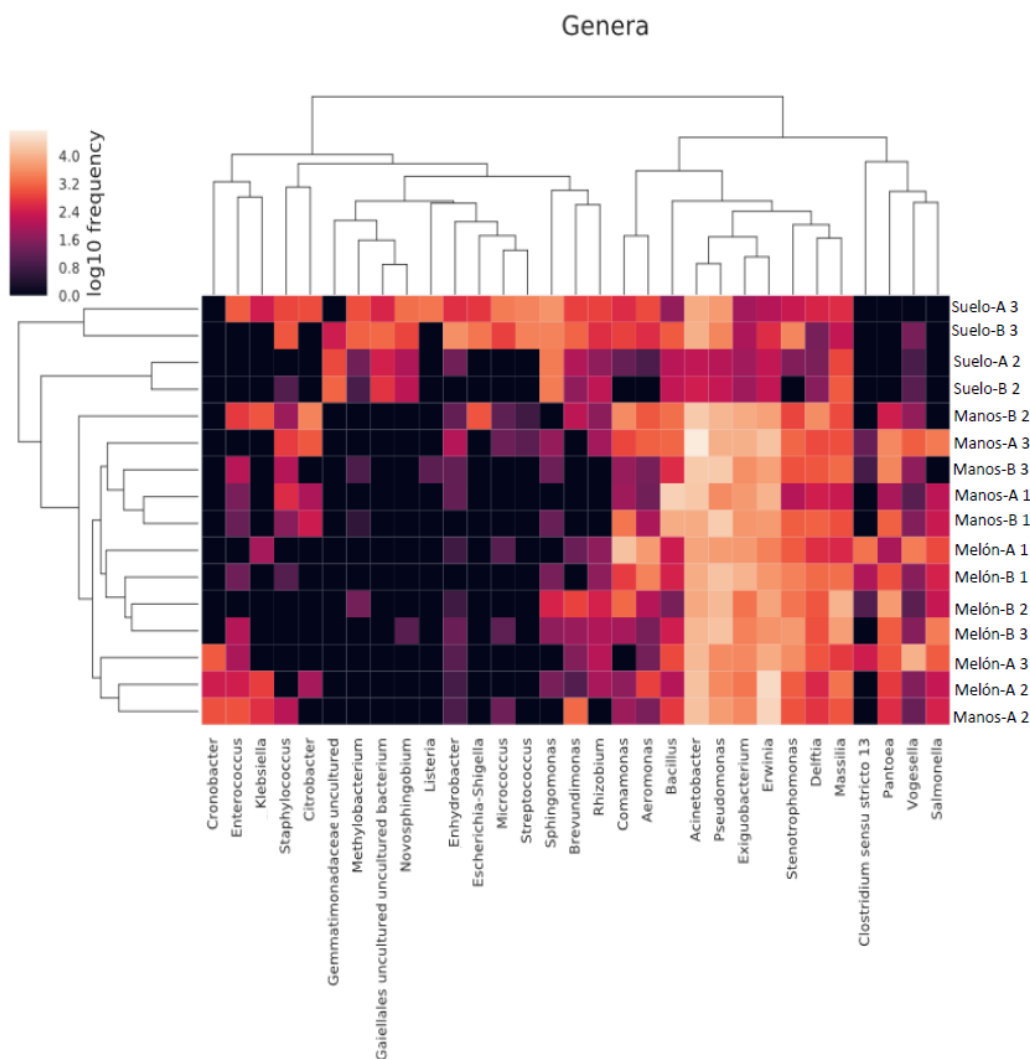


Fig. 10 Mapa de calor con los 30 géneros más abundantes acomodado con un análisis jerárquico de conglomerados basado en las abundancias relativas en las muestras de suelo, melón y manos de las huertas A y B.

7.5.3 Abundancia relativa de enteropatógenos y fitopatógenos

Se realizó la tabla de frecuencia porcentual relativa de las lecturas en cada muestra en las que fueron detectadas (Tabla 5). Lecturas de *Escherichia-Shigella* fueron detectadas en muestras suelo del tercer muestreo de ambas huertas (Suelo-A3, Suelo-B3) y en el primer muestreo de manos de la huerta B (Manos-B1). Lecturas de *Salmonella* fueron encontradas en las muestras de manos y melón de los tres muestreos de las dos huertas, *Listeria* en la muestra de manos de la huerta B del tercer muestreo y en la muestra de suelo de la huerta A del tercer muestreo.

Tabla 5. Abundancia Relativa de los principales patógenos encontrados en frutos y su ambiente.

Patógeno		<i>Escherichia-Shigella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>
Muestra (huerta)		Abundancia Relativa (%)		
Melón	A 1	-	1.58	-
	A 2	-	0.32	-
	A 3	-	2.42	-
	B 1	-	0.54	-
	B 2	-	0.34	-
	B 3	-	4.9	-
Manos	A 1	-	0.23	-
	A 2	-	0.5	-
	A 3	-	2.33	-
	B 1	1.64	0.38	-
	B 2	-	-	-
	B 3	-	-	0.02
Suelo	A 2	-	-	-
	A 3	1.16	-	4.76
	B 2	-	-	-
	B 3	3.45	-	-

A y B: huerta de origen; 1: primera visita, 2: segunda visita, 3: tercera visita

Además, se realizó una búsqueda de fitopatógenos bacterianos presentes en el ambiente, identificando géneros pertenecientes a *Serratia*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Rhizobium*, *Streptomyces* y *Acidovorax* (Tabla 6).

En todas las muestras se detectaron taxones del género *Pseudomonas* y *Erwinia*. Para el caso de *Serratia* se identificó en muestras de melón y manos de la huerta B, *Pectobacterium* y *Acidovorax* se detectaron únicamente en las muestras de melón de la huerta B, *Rhizobium* fue detectado en muestras de melón y suelo de ambas huertas, así como *Streptomyces* en muestras de melón y suelo de ambas huertas.

Tabla 6 Abundancia relativa porcentual de géneros de Bacterias fitopatógenas encontradas en las muestras.

Fitopatógeno		<i>Serratia</i>	<i>Pectobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Acidovorax</i>
Muestra (huerta)		Abundancia relativa (%)						
Melón	A 1	-	-	10.7	5.63	0.09	-	-
	A 2	-	-	6.2	50.8	0.16	-	-
	A 3	-	-	7.43	16.4	0.27	0.04	-
	B 1	0.04	0.04	28.6	8.8	0.09	0.01	0.19
	B 2	0.9	0.04	21.6	12.6	0.52		0.26
	B 3	-	-	29	8.75	0.21	0.02	-
Manos	A 1	-	-	6.1	16.1		0.04	-
	A 2	0.2	-	9.8	43.7		0.01	-
	A 3	-	-	9.2	15	0.08	0.01	-
	B 1	0.04	-	35.5	9.8		-	-
	B 2	0.29	-	17.5	10.1	0.07	-	-
	B 3	0.09	-	33.1	10.8		-	-
Suelo	A 2	-	-	0.35	0.47	0.13	0.45	-
	A 3	-	-	12	0.26	1.57	-	-
	B 2	-	-	0.37	0.36	0.33	0.41	-
	B 3	-	-	5.06	0.62	0.65	0.35	-

A y B: huerta de origen; 1: primera visita, 2: segunda visita, 3: tercera visita

8. Discusión

La relación que existe entre una planta y los microorganismos que la rodean es compleja siendo esto de interés para los investigadores por muchos años. Gracias a la implementación de la metagenómica se han podido describir microorganismos que son considerados microbiota nativa de un ecosistema. Estas tecnologías también se han implementado en productos alimenticios donde se han enfocado en la identificación de esta microbiota presente en frutas y verduras, con la finalidad de observar cómo es que estas poblaciones microbianas interactúan con el producto, y como son afectadas por condiciones ambientales y la interacción de estas poblaciones con patógenos (Cao *et al.* 2017).

En el presente estudio realizamos el análisis de las poblaciones bacterianas presentes en un ambiente agrícola productor de melón, identificamos poblaciones bacterianas localizadas en melón, manos de pizzadores y suelo de dos huertas ubicadas en Paila, Coahuila; además de la comparación entre los tipos de muestras y entre las huertas.

En este análisis, se encontró un total de 2,777 OTUs únicos lo que se traduce en la presencia de 2,777 especies bacterianas presentes entre las dos huertas. Nuestros análisis indicaron que la mayor abundancia de especies se encuentra principalmente en el suelo (Tabla 4) en donde existe la mayor diversidad de procariotas. Se han reportado que el suelo puede contener hasta 1000 especies bacterianas diferentes (Delmont *et al.* 2011).

Cabe mencionar que en nuestra investigación encontramos mayor cantidad de microorganismos en el segundo muestreo que en el primero independientemente de la huerta, presentando de 1000 a 1300 OTUS, comparado con el tercer muestreo de suelo que tuvieron de 60 a 300 OTUs. Lo anterior puede ser explicado probablemente por cambios ambientales que favorecieron la proliferación de taxones en el suelo como temperatura y pH que pueden tener un impacto en las poblaciones microbianas presentes

tanto en el suelo como en las plantas (Turnet *et al.* 2013). Sin embargo, estas alteraciones de las condiciones abióticas no mostraron tener efecto en la abundancia de las comunidades bacterianas presentes en el melón y las manos, debido que en los tres muestreos las poblaciones fueron muy similares.

Dado que se ha reportado que el pH influye en la diversidad bacteriana presente en el suelo (Lauber *et al.* 2009), al realizar nuestro análisis de diversidad α , encontramos poblaciones muy parecidas, aunque presentaron diferentes texturas de suelo. Esto pudiera deberse en parte a que el pH es considerado uno de los factores que más influyen en la biodiversidad, aparte del carbón orgánico presente en el suelo (Cederlund *et al.* 2014), reacciones redox (Ridge y Firestone, 2005) y humedad (Fierer, 2017). En cambio, la textura, estructura y la temperatura del suelo tienen un impacto menor sobre la biodiversidad, pero contribuyen a alterar la humedad del suelo (Chau *et al.* 2011) por lo que, a pesar de presentar texturas diferentes, la diversidad de ambas huertas fue similar. El impacto de las condiciones ambientales también se observó en los análisis de uniformidad, mostrando que no hubo una diferencia significativa en la distribución de las especies entre las huertas, solo entre muestras, siendo las de suelo, las que presentaron una distribución más uniforme en comparación a las de manos y melón.

En cuanto a los análisis de clasificación taxonómica, solo llegaron a nivel de género, esto debido a que el tamaño del fragmento amplificado (250-300 bases) no fue suficiente para hacer la distinción entre las especies encontradas en un ambiente ya que para ello se requieren generalmente la secuenciación del gen 16S completo aunado a que la mayoría de los microorganismos se encontraron como organismos no clasificados completamente en las bases de datos más actuales (Quast *et al.* 2013).

Nuestros resultados indicaron que las muestras de manos y melón, de ambas huertas presentaron taxones similares. Con anterioridad se había reportado que el entorno afectaba a las comunidades bacterianas presentes en la piel, incluyendo las manos (Prescott *et al.* 2017), la microbiota de la piel puede realizar intercambios de

microorganismos con las del ambiente tanto en humanos como animales y vegetación, por lo que es común encontrar similitud y debe de ser considerado en las comparaciones de poblaciones bacterianas entre manos y melón (Flandroy *et al.* 2018). Por lo tanto, concluimos que las manos y melón presentan una biodiversidad similar por el hecho que compartir un mismo nicho ecológico.

Los filos dominantes en todas las muestras fueron *Proteobacteria* (80-90% en toda las muestras), *Firmicutes* (1-10% en toda las muestras), y *Actinobacteria* (<1% en melón y manos, 10-20% en suelos), estos filos han sido detectados como los más abundantes en la superficie de distintos tipos de frutas, como en el caso de manzanas, peras y duraznos (Leff y Fierer, 2013), también han sido reportados como dominantes en diferentes frutos de plantas perteneciente al género *Cucumis*, como en *C. callosus*, *C. melo* var. *Reitulatus* y *C. melo* var. *Momordica*, siendo los más abundantes como microorganismos endófitos en los frutos (Glassner *et al.* 2015).

Otros filos identificados en este trabajo incluyeron *Bacterioidetes*, *Cloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae* *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacterias*, *Armatimonadetes*, *BRC1*, *Chlorobi*, *TM6*, *Tectomicrobia*, y *WS2*, además de la detección de múltiples *Archaeas* como *Thaumarchaeota*, *Euryarchaeota* y *Woesearchaeota* presentes únicamente en las muestras de suelo de ambas huertas. Estudios de suelo identificaron los filos *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Proteobacterias*, *Planctomycetes* y *Actinobacterias* como los más abundantes (Crowther *et al.*; 2014), que también han sido reportados como los más abundantes al analizar la microbiota del suelo y rizosfera de la familia de las cucurbitáceas, como en el caso de *Cucurbita pepo* y *Cucumis sativus*, donde se reportaron los mismos filos a una abundancia relativa similar en comparación con los encontrados en los suelos analizados en este estudio (Adam *et al.* 2018; Zhou y Wu, 2018), lo que significa que encontramos las mismas poblaciones bacterianas en el suelo de las huertas productoras de melón en comparación a huertas productoras de otras cucurbitáceas.

Las clases más abundantes en todas las muestras que se identificaron fueron *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacilli*, *Betaproteobacteria*, tomando en cuenta que *Gammaproteobacteria* abarca hasta el 60% de las lecturas totales en toda las muestras; mientras que *Actinobacteria*, *Sphingobacteria* y *Clostridia* presentaron elevada cantidad de lecturas en suelo y melón, no así en manos donde fue mínima o nula. Todas estas clases han sido reportadas como las predominantes en productos, como en el tomate, espinaca, lechuga, chile, fresas, manzanas, pepinos y peras siendo reportados como comensales de la cáscara de estos productos vegetales (Telias et al. 2011; Leff y Fierer 2013). Hasta este estudio, no hay reportes de las clases más abundantes en el melón.

Entre los Órdenes más abundantes en todas las muestras se encontraron los *Pseudomonadales* (38%), *Enterobacteriales* (18%), *Bacillales* (12%), *Areomonadales* (1.4%), *Xanthomonadales* (3%), y *Lactobacillales* (1.3%) abarcando la mayoría de las lecturas en todas las muestras, en donde *Pseudomonas* y *Bacillares* se encontraron como las más abundantes en manos, formando el 49% y 18% respectivamente del total de las lecturas en estas muestras. Estas Ordenes han sido reportados como los más abundantes en la superficie de tomate y pepino (Allard, 2016), así mismo se ha reportado que están relacionados con en el ciclo de nutrientes y en la degradación de material vegetal en el ambiente (Thoumas 2005). De igual manera que con las clases más abundantes, no encontramos reportes de los ordenes dominantes presentes en el melón.

A nivel de familia los taxones más abundantes en las muestras fueron *Bacillaceae* (4.3%), *Comamonadaceae* (4.5%), *Oxalobacteraceae* (3.3%), *Moraxellaceae* (23%), *Xanthomonadaceae* (3%) y *Pseudomonadaceae* (14.6%). Todas ellas se han reportado como comensales del ambiente, encontrándose en el melón, el suelo y las manos de los pizcadores. De estas familias, *Moraxellaceae* fue el taxón más abundante en todas las muestras. También se encontró que *Bacillaceae* presentó mayor abundancia en manos (8.9%) en comparación con suelos (1.2%) y melón (0.5%), mientras que *Xantomonadaceae* y *Pseudomonadaceae* presentaron especies que han sido clasificadas como fitopatógenos (der Wolf y de Boer, 2014). Entre las familias de

interés, por presentar organismos patógenos para el humano se encuentran *Enterobacteriaceae*, y *Listeriaceae* (Callejón *et al.* 2015).

En cuanto a géneros, identificamos a *Pseudomonas* (14%), *Acinetobacter* (22%) y *Erwinia* (13.4%) como los taxones más abundantes en todas las muestras, siendo géneros comensales del ambiente. En este estudio también se encontró que en las muestras de manos los géneros *Bacillus* (8%), *Citrobacter* (1.1%) fueron más abundantes en comparación del melón y suelo. De igual manera, en melón se encontró que *Comamonas* (5%), *Pantoea* (2.8%), *Clostridium sensu stricto* 13 (0.73%), *Vogesella* (3.9%) y *Aeromonas* (2.8%) presentaron mayor abundancia mayor en comparación a las otras muestras y se encontró que los géneros *Staphylococcus* (0.9%), *Methylobacterium* (1.2%), *Enhydrobacter* (2.3%), *Micrococcus* (1.64%), *Rhizobium* (0.68%) fueron más abundantes en suelo que en melón y manos. Estos últimos 5 géneros han sido descritos como comensales del suelo y la rizosfera de cucurbitáceas, siendo detectados como los más abundantes en *Cucumis sativus* L y *Cucurbita pepo* (Mahaffee y Klopepper, 1996; Zhou X y Wu F. 2018).

Se identificaron los géneros *Listeria*, *Escherichia-Shigella*, microorganismos de importancia en inocuidad alimentaria, en muestras de suelo y manos; y *Salmonella* en manos y melón. Estos géneros están relacionados con reportes de brotes debido al consumo de melón contaminado en Estados Unidos (CDC, 2013 y 2017).

La abundancia relativa que encontramos nos permitió determinar la presencia de las poblaciones microbianas presentes en las muestras. Nuestros estudios demostraron una abundancia relativa de *Escherichia* de 1.64 a 3.45% en muestras de suelo y en manos. Aunque no ha sido reportado la abundancia relativa de *Escherichia* en suelo, estudios enfocados a la detección de este género en productos vegetales han reportado una abundancia de 0.5 – 1% de especies de *Escherichia* en muestras de lechugas y 0.5 - 1% en espinacas (Leonard *et al.* 2015); cabe señalar que en este estudio solo se reportó la presencia de este género, sin especificar especies patógenas en el suelo y manos de pizcadores.

A su vez identificamos el género *Salmonella* en muestras de manos y de suelo de ambas huertas, con abundancia relativa de 0.3 a 4.42%. Este género se divide en dos especies, *S. enterica* y *S. bongori*, ambas patógenas para el humano, siendo el principal causante de brotes por el consumo de melón (Walsch, 2014; CDC, 2013). Diversos reportes han identificado a *Salmonella* con una abundancia relativa de 0.5 a 1% en tomates (Ottesen et al., 2013), 4.8% en muestras compuestas de cilantro (Jarvis et al., 2015), mientras que en ensaladas se identificó con una abundancia relativa del 0.9% (Berg et al. 2014). Con lo anterior concluimos que la abundancia relativa encontrada en nuestras muestras puede ser típica del ambiente en donde se cosecha el melón.

Respecto a *Listeria*, se detectó en suelo de la huerta A con una abundancia relativa de 4.76%, aunque no existe información respecto a la abundancia relativa por secuenciación de *Listeria* en el suelo, se ha reportado hasta una abundancia de 8.3% de *L. monocytogenes* en el suelo de granjas por cultivo y aislamiento (Vivant et al. 2013). A pesar de que identificamos *Listeria*, hay que recordar que no todas las especies son patógenas (Orsi y Wiedmann, 2016), por lo que se requiere un análisis más a fondo para una confirmación de las especies detectadas en las muestras de *Listeria*.

En el ámbito de bacterias fitopatógenas, encontramos géneros que pueden afectar la producción de melón. En este caso, el género *Erwinia* fue uno de los más abundantes encontrado en nuestro estudio representando una abundancia de hasta del 50.8% en melón y 45.7% en manos. De igual manera, *Pseudomonas* presentó una abundancia alta en melón y manos siendo de 29 y 35% respectivamente, mientras que en suelo *Erwinia* tiene una abundancia de 0.62 y *Pseudomonas* de 12% respectivamente. Estos géneros aparte de ser los más abundantes en las muestras presentan tanto especies que afectan la salud de los cultivos, causantes del deterioro de frutos como cítricos, manzanas y cucurbitáceas, causando marchitez y pudrición blanda por *Erwinia amylovora* y *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* respectivamente (Rosa 2001; der Wolf y de Boer, 2014).

Entre los géneros comensales identificados, encontramos a *Rhizobium*, con una abundancia de 0.21, 0.08 y 1.57% en melón, manos y suelo respectivamente, indicando que es más abundante en suelo y que su presencia en melón y manos es debida

probablemente a la tierra presente en los frutos y manos durante el proceso de recolección. Este género además de ser comensal de la rizosfera está involucrado en el ciclo de nitrógeno de las plantas, aunque presenta especies patogénicas que afectan principalmente la raíz (Schröder et al.2016; Soto et al. 2006).

Un género de importancia aquí detectado en este trabajo fue *Serratia*, ya que presenta especies comensales del ambiente y fitopatógenos, siendo relacionado con enfermedades que afectan a cucurbitáceas, principalmente causados por *S. marcescens* fitopatógena (Zhang et al. 2005). Este taxón se detectó en muestras de melón y manos de la huerta B, con una abundancia de 0.0 4-0.9%. Actualmente, no se tiene un reporte sobre la abundancia relativa de *Serratia* en suelo o frutos por métodos de secuenciación, sin embargo, por métodos microbiológicos convencionales se ha reportado una abundancia relativa de 0.81% en hojas de olivo (Ercolani, 1991).

Otros fitopatógenos de melón también identificados pertenecen a los géneros de *Pectobacterium* y *Acidovorax*, causantes de la aparición de manchas en los frutos y pudrición blanda (Fiallos y Reis, 2009). Detectamos una abundancia relativa de 0.19 y 0.26% de los géneros respectivos, en las muestras de melón de la huerta B, sin detectarse lecturas de estos en la huerta A. A pesar de haberse encontrado en abundancia menor del 1%, las enfermedades al melón causadas por estos patógenos han causado pérdidas de hasta un 90% en Estados Unidos y el norte de Brasil, por lo que si las condiciones permiten la proliferación de estos microorganismos, estos pueden causar pérdidas graves (Kumagai et al. 2014;Garces y Melo, 2009) por lo que la detección de *Pectobacterium* y *Acidovorax* en las muestras es de importancia para evitar su propagación y que afecte la producción de este fruto.

9. CONCLUSIONES

- 1.- La diversidad bacteriana fue similar en ambas huertas.
- 2.- Las muestras de suelo presentaron mayor biodiversidad, en tanto que las muestras de manos y melón presentan una biodiversidad similar.
- 3.- Se detectaron taxones que se encuentran presente solo en una clase de muestra,
- 4.- Los filos *Proteobacterias*, *Firmicutes* y *Actinobacterias*, fueron los más abundantes en los tres tipos de muestras.
- 5.- Se identificaron géneros de enteropatógenos que históricamente han sido relacionados a brotes de melón, principalmente *Salmonella* con una abundancia relativa de 4.9% en melón.
- 6.- Los géneros *Escherichia* y *Listeria* agrupan especies patógenas como no patógenas, y con el método utilizado en este trabajo, no podemos concluir si los microorganismos presentes en las muestras analizadas pudieran representar un peligro para los consumidores.
- 7.- Se encontraron géneros fitopatógenos *Pectobacterium* y *Acidovorax* en las muestras de melón de la huerta B.

10. ANEXOS

10.1 Anexo 1: Análisis estadísticos

Tabla 7 Kruskal-Wallis por pares del análisis de diversidad filogenética entre huertas.

Group 1	Group 2	H	p-value	q-value
A (n=8)	B (n=8)	0.17647059	0.67442407	0.67442407

Tabla 8 Kruskal-Wallis por pares del análisis de diversidad filogenética entre tipo de muestras.

Group 1	Group 2	H	p-value	q-value
Manos (n=6)	Melón (n=6)	7.410256	0.006485	0.010515
Manos (n=6)	Suelo (n=4)	6.545455	0.010515	0.010515
Melón (n=6)	Suelo (n=4)	6.545455	0.010515	0.010515

Tabla 9 Kruskal-Wallis por pares del análisis de diversidad filogenética entre muestras separadas por la huerta de procedencia.

Group 1	Group 2	H	p-value	q-value
Manos-A (n=3)	Manos-B (n=3)	0.04761905	0.82725935	0.82725935
Manos-A (n=3)	Melón-A (n=3)	2.33333333	0.12663046	0.14611207
Manos-A (n=3)	Melón-B (n=3)	3.85714286	0.04953461	0.11354252
Manos-A (n=3)	Suelo-A (n=2)	3	0.08326452	0.11354252
Manos-A (n=3)	SoilSJ (n=2)	3	0.08326452	0.11354252
Manos-B (n=3)	Melón-A (n=3)	3.85714286	0.04953461	0.11354252
Manos-B (n=3)	Melón-B (n=3)	3.85714286	0.04953461	0.11354252
Manos-B (n=3)	Suelo-A (n=2)	3	0.08326452	0.11354252
Manos-B (n=3)	Suelo-B (n=2)	3	0.08326452	0.11354252
Melón-A (n=3)	Melón-B (n=3)	2.33333333	0.12663046	0.14611207

Melón-A (n=3)	Suelo-A (n=2)	3	0.08326452	0.11354252
Melón-A (n=3)	Suelo-B (n=2)	3	0.08326452	0.11354252
Melón-B (n=3)	Suelo-A (n=2)	3	0.08326452	0.11354252
Melón-B (n=3)	Suelo-B (n=2)	3	0.08326452	0.11354252
Suelo-A (n=2)	Suelo-B (n=2)	0.6	0.43857803	0.46990503

Tabla 10 Kruskal-Wallis por pares del análisis de uniformidad entre huertas.

Group 1	Group 2	H	p-value	q-value
A (n=8)	B (n=8)	2.82352941	0.09289194	0.09289194

Tabla 11 Kruskal-Wallis por pares del análisis de uniformidad entre tipo de muestras.

Group 1	Group 2	H	p-value	q-value
Manos (n=6)	Melón (n=6)	0.230769	0.630954	0.630954
Manos (n=6)	Suelo (n=4)	6.545455	0.010515	0.015773
Melón (n=6)	Suelo (n=4)	6.545455	0.010515	0.015773

Tabla 12 Kruskal-Wallis por pares del análisis de uniformidad entre tipo de muestras separadas por su huerta de procedencia.

Group 1	Group 2	H	p-value	q-value
Manos-A (n=3)	Manos-B (n=3)	2.33333333	0.12663046	0.1726779
Manos-A (n=3)	Melón-A (n=3)	0.42857143	0.51269076	0.54931153
Manos-A (n=3)	Melón-B (n=3)	3.85714286	0.04953461	0.12489677
Manos-A (n=3)	Suelo-A (n=2)	3	0.08326452	0.12489677
Manos-A (n=3)	Suelo-B (n=2)	3	0.08326452	0.12489677
Manos-B (n=3)	Melón-A (n=3)	1.19047619	0.27523352	0.34404191
Manos-B (n=3)	Melón-B (n=3)	0.04761905	0.82725935	0.82725935
Manos-B (n=3)	Suelo-A (n=2)	3	0.08326452	0.12489677
Manos-B (n=3)	Suelo-B (n=2)	3	0.08326452	0.12489677
Melón-A (n=3)	Melón-B (n=3)	3.85714286	0.04953461	0.12489677
Melón-A (n=3)	Suelo-A (n=2)	3	0.08326452	0.12489677
Melón-A (n=3)	Suelo-B (n=2)	3	0.08326452	0.12489677
Melón-B (n=3)	Suelo-A (n=2)	3	0.08326452	0.12489677
Melón-B (n=3)	Suelo-B (n=2)	3	0.08326452	0.12489677
Suelo-A (n=2)	Suelo-A (n=2)	0.6	0.43857803	0.50605157

11. BIBLIOGRAFIA

1. Adam E, Bernhart M, Müller H, Winkler J, Beg G. 2018. The *Cucurbita pepo* seed microbiome: genotype-specific composition and implications for breeding. *Plant and Soil* 422 (1-2): 35-49.
2. Alkema W, Boekhorst J, Wels M, van Hijum SAFT. 2016. Microbial bioinformatics for food safety and production. *Briefings in Bioinformatics* 17(2): 283-292.
3. Allard SM. 2016. Bacterial communities of the specialty crop phyllosphere: response to biological soil amendment use, rainfall, and insect visitation. Digital Repository at the University of Maryland: 1-131.
4. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990 Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3):403-10
5. Anvarian AHP, Cao Y, Srikumar S, Fanning S, Jordan K. 2016. Flow cytometric and 16S sequencing methodologies for monitoring the physiological status of the microbiome in powdered infant formula production. *Frontiers in Microbiology* 7:968.
6. Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Moya A, Mira A. 2011. Mining virulence genes using metagenomics. *PLoS One* 6(10): e24975
7. Berg G, Erlacher A, Smalla K, Krause R. 2014. Vegetable microbiomes: is there a connection among opportunistic infections, human health and our 'gut feeling'?. *Microbial Biotechnology* (6):487-95.
8. Berlec A. 2012. Novel techniques and findings in the study of plant microbiota: search for plant probiotics. *Plant Science* 193-194:
9. Bokulich NA, Mills DA. 2013. Facility-specific “house” microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. *Applied and Environmental Microbiology* 79(17):5214-5223.
10. Bowen A, Fry A, Richards G, Beauchat L. 2006. Infections associated with cantaloupe consumption: a public health concern. *Epidemiology and Infection* 134(4): 675-685.
11. Bramucci M, Nagarajan V. 2006. Bacterial communities in industrial wastewater bioreactors. *Current Opinions in Microbiology* 9(3): 275-8.
12. Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, van Themaat EVL, Schulze-Lefert P. 2016. Structure and functions of the bacterial microbiota 64:807-838.
13. Callejón RM, Rodríguez-Naranjo MI, Ubeda C, Ortega RH, García-Parrilla MC, Troncoso AM. 2015. Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the

united states and European union: trends and causes. *Foodborne Pathogens and Decease* 12(1): 32-38.

14. Cao Y, Fanning S, Proos S, Jorgan K, Srikumar S. 2017. A review on the application of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. *Frontiers in Microbiology* 8:1829.
15. Caplice E, Fitzgerald GF. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50:131-149.
16. Carmen CM, Hernandez M. 2007. Identification and differentiation of *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* species in fermented milk products with bifidobacterial. *Microbiological Research* 162(1):86-92.
17. Cederlund H, Wessén E, Enwall K, Jones CM, Juhanson J, Pell M, Philippot L, Hallin S. 2014. Soil carbon quality and nitrogen fertilization structure bacterial communities with predictable responses of major bacteria phyla. *Applied Soil Ecology* 84: 62-68.
18. Centers for Disease Control and Prevention. 2012. Multistate outbreak of listeriosis linked to whole cantaloupes from Jensen farms, Colorado (final update)[Online] Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html>. Consultado el 23 de Enero del 2018.
19. Centers for Disease Control and Prevention. 2017. Listeria (Listeriosis) symptoms. [Online] Disponible en: <https://www.cdc.gov/spanish/listeria/symptoms.html>. Consultado el 23 de Enero del 2018.
20. Centers of Disease Control and Prevention (CDC), 2013. Multistate Outbreak of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Newport Infections Linked to Cantaloupe (Final Update) [Online] Disponible en: <https://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-cantaloupe-08-12/index.html>. Consultado el 23 de Enero del 2018.

21. Centers of Disease Control and Prevention (CDC), 2017. Reports of selected E. coli outbreak investigations. [online] Disponible en www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html Consultado el 23 de Enero del 2018.
22. Chau JF, Bagtzoglou AC, Wilig MR, 2011. The effect of soil texture on richness and diversity of bacterial communities. *Environmental Forensics* 12:333-341.
23. CONABIO. 2011. Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad. [Online] Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20912_sg7.pdf. Consultado el 23 de enero del 2018
24. Crowther TW, Maynard DS, Leff JW, Oldfield EE, McCulley R, Fierer N, Bradford MA. 2014. Predicting the responsiveness of soil biodiversity to deforestation: a cross.biome study. *Global Change Biology* 20: 2983-2994.
25. Culligan EP, Sleator RD, Marchesi JR, Hill C. 2013. Metagenomics and novel gene discovery: promise and potential for novel therapeutics. *Virulence* 5(3):399-412.
26. Culligan EP, Sleator RD, Marchesi JR, Hill C. 2013. Metagenomics and novel gene discovery: promise and potential for novel therapeutics. *Virulence* 5(3):399-412.
27. Daniel R. 2004. The soil metagenome – a rich resource for the discovery of novel natural products. *Current opinions in Bacteriology* 15:199-204.
28. Delmont TO, Robe P, Cecillon S, Clark IM, Constancias F, Simonet P, Hirsch PR, Vogel TM. 2011. Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 77(4): 1315-1324.
29. der Wolf J, de Boer SH. 2014. Phytopathogenic bacteria in: *Principles of plant-microbe interaction: microbes for sustainable agriculture*, Ed. Ben Lugtenberg. Springer. pp. 65-77.
30. Ercolani GL. 1991. Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time. *Microbial ecology* 21(1):35-48.
31. Ercolini D. 2013. High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology* 79(10):3148-3155.

32. Fadrosh EAE, Espino DP, Jarett J, Dunfield PF, Hedlung BP, Dekas AE, Grasby SE, Brady AL, Dong H, Briggs BR, Li WJ, Goudeau D, Malmstrom R, Pati A, Ridge JP, Rubin EM, Woyke T, Krypides NC, Ivanova NN. 2015. Global metagenomic survey reveals a new bacterial candidate phylum in geothermal springs. *Nature Communications* 7:10476.
33. Faith DP, Baker AM. 2006. Phylogenetic diversity (PD) and biodiversity conservation: some bioinformatics challenges. *Evolutionary Bioinformatics* 2: 121-128.
34. Fiallos FRG, Reis EM. 2009. Control de bacteriosis en el cultivo de melón. *Ciencia y Tecnologia* 2(2): 1-6.
35. Fierer N. (2017). Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Review Microbiology* 15(10): 579-590.
36. Flandroy L, Poutahidis T, Berg G, Clarke G, Dao MC, Decaestecker E, Furman E, Haahtela T, Massart S, Plovier H, Sanz Y, Rook G. 2018. The impact of human activities and lifestyles on the interlinked microbiota and health of humans and ecosystems. *Science of the Total Environment* 627; 1018-1038.
37. Food Safety News. 2015. Fresh produce responsible for most foodborne illnesses in the U.S. [Online] Disponible en: <http://www.foodsafetynews.com/2015/12/report-fresh-produce-responsible-for-most-foodborne-illness-outbreaks/> . Consultado el 26 de Enero del 2018.
38. Frostegård Å, Tunlid A, Bååth E. 2011. Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 43(8):1621-1625.
39. Gilbert JA, Jansson JK, Knight R. 2014. The Earth microbiome project: successes and aspirations. *BioMed Central Biology* 12: 69.
40. Gomez-Alvarez V, Revetta RP, Santo JWD. 2012. Metagenomic analyses of drinking water receiving different disinfection treatments. *Applied and Environmental Microbiology* 78(17): 6095-6102.
41. Guazzaroni ME, .2010. Metagenomic mining of enzyme diversity In: *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* Eds: Timmis KN. Springer, Berlin, Heidelberg pp. 2911-2927.

42. Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology* 5: R245-249.
43. Heredia N, Caballero C, Cárdenas C, Molina K, García R, Solis L, Burrowes V, Bartz FE, Fabiszewski A, Jaykus LA, García S, Leon J. 2016. Microbial indicator profiling of fresh produce and environmental samples from farms and packing facilities in northern Mexico. *Journal of Food Protection* 79 (7): 1197-1209.
44. Heritage J, Evans EGV, Killington RA. 1999. The microbiology of soil and of nutrient cycling in: *Microbiology in action*. Cambridge University Press: Cambridge, pp. 1-10.
45. Hill GT, Mitkowski NA, Aldrich-Wolfe L, Emele LR, Jurkoine DD, Ficke A, Maldonado-Ramirez S, Lynch ST, Nelson EB. 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 15:25-36.
46. Illumina Inc. 2012. Metagenomics research reviews: an overview of publications featuring Illumina technology. [Online] Disponible en: <http://www.science.smith.edu/departments/cmbs/documents/metagenomicsresearchreview.pdf>
47. Jarvis KG, White JR, Grim CJ, Ewing L, Otesen AR, Beabrun JJG, Pettengill JB, Brown E, Hanes DE. 2015. Cilantro microbiome before and after nonselective pre-enrichment for *Salmonella* using 16S rRNA and metagenomic sequencing. *BMC Microbiology* 15:160.
48. Jung JY, Lee SH, Kim JM, Park MS, Bae JW, Hahn Y, Madsen EL, Jeon CO. 2011. Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Applied Environmental Microbiology* 77(7):2264-74.
49. Junttila S, Lim KJ, Rudd S. 2009. Optimization and comparison of different methods for RNA isolation for cDNA library construction from the reindeer lichen *Cladonia rangiferina*. *MioMed Research Notes* 2: 204

50. Kirk JL, Beaudette LA, Miranda H, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58:169-188.
51. Kostic AD, Howitt MR, Garrett WS. 2013. Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. *Genes & Development* 27:701-718.
52. Kunin V, Copeland A, Lapidus A, Mavromatis K, Hugenholtz. 2008. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72(4): 557-578.
53. Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial communities' structure at the continental scale. *Applied Environmental Microbiology* 75(15): 5111-20.
54. Law JWF, Mutalib NS, Chan KG. 2014. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology* 5:770.
55. Leff JW, Fierer N. 2013. Bacterial communities associated with the surfaces of fresh fruits and vegetables. *PLOS ONE* 8(3): e59310.
56. Leonard SR, Mammel MK, Lacher DW, Elkins CA. 2015. Application of metagenomic sequencing to food safety: detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* on fresh bagged spinach. *Applied and Environmental Microbiology* 81(23):8183-8191.
57. Li Z, Want Y, Li J, He L, He Y, Wang S. 2016. Metagenomic analysis of genes encoding nutrient cycling pathways in the microbiota of deep-sea and shallow-water sponges. *Marine Biotechnology* 18: 659-671.
58. Luo C, Tsementzi D, Kyrpides N, Read T, Konstantinidis KT. 2011. Direct comparison of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PLoS One* 7(2): e30087.
59. Mahaffee WF, Kloepper JR. 1996. Temporal Changes in the Bacterial Communities of Soil, Rhizosphere, and Endorhiza Associated with Field-Grown Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Microbial Ecology* 34(3): 210-23.
60. Marti R, Scott A, Tien YC, Murray R, Sabourin L, Zhang Y, Topp E. 2013. Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Applied and Environmental Microbiology* 79(18): 5701-9.

61. Mayo B, Rachd CTCC, Alegria Á, Leite AMO, Peixoto RS, Delgado S. 2014. Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology. *Current Genomics* 15(4): 293-309.
62. Méndez-García C, Peláez AI, Mesa V, Sánchez J, Golyshina OV , Ferrer M .2015. Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. *Frontiers in Microbiology* 6: 475.
63. Mirete S, Morgante V, Pastor JEG. 2016. Functional metagenomics of extreme environments. *Current Opinion in Biotechnology*
64. Myrold DD, Zeglin LH, Jansson JK. 2013. The potential of metagenomic approaches for understanding soil microbial processes. *Soil Sciences Society of America* 78:3-10.
65. Nalbantoglu U, Cakar A, Dogan H, Abaci N, Duran U, Sayood K, Can H. 2014. Metagenomic analysis of the microbial Community in kefir grains. *Food Microbiology* 41: 42-51.
66. Orsi RH, Wiedmann M. 2016. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100: 5273-5287.
67. Ottesen A, González A, Bell R, Pettengill JB. 2013. Co-enriching microflora associated with culture based methods to detect *Salmonella* from tomato phyllosphere. *POLSONe* 8(9): e73079.
68. Pajares S, Bohannan BJM, Souza V. 2016. The role of microbial communities in tropical ecosystems. *Frontiers in Microbiology* 7: 1805.
69. Park ST, Kim J. 2016. Trends in the next-generation sequencing and a new era for whole genome sequencing. *International Neurology Journal* 20(supp 2): S76-83.
70. Peng M, Zi X, Wang Q. 2015. Bacterial community diversity of oil-contaminated soils assessed by high throughput sequencing of 16S rRNA genes. *International Journal of Environmental Research and Pubic Health* 12:12002-12015.
71. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McIness P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, McEwen JE, Wetterstrand KA, Deal C, Baker CC, Francesco V, Howcroft TK, Karp RW, Lunsford RD, Wellington CR, Belachew T, Wright M, Giblin C, David H, Mills M, Salomon R, Mullins C, Akolkar B, Begg L, Davis C,

- Grandison L, Humble M, Khalsa J, Little RA, Peavy H, Pontzer C, Portnoy M, Sayre MH, Starke-Reed P, Zakhari S, Read J, Watson B, Guyer M. 2009. The NIH human microbiome project. *Genome Research* 19(12): 2317-2323.
72. Popowska M, Rzeczycka M, Miernik A, Balska AK, Walsh F, Duffy B. 2012. Influence of soil use on prevalence of tetracycline, streptomycin and erythromycin resistance and associated resistance genes. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 56(3): 1434.
73. Prescott SL, Larcombe DL, Logan AC, West C, Birks W, Caraballo L, Levin M, Etten EV, Horwitz P, Kozyskyj Campbell DE. 2017. The skin microbiome: impact of modern environments on skin ecology, barrier integrity, and systemic immune programming. *World Allergy Organization Journal* 10(1):29.
74. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41: D590-596.
75. Quezada Á, Sánchez GE, Muños E, Martínez LR, Villalobos E. 2008. Diagnóstico de la calidad microbiológica de frutas y hortalizas en Chihuahua, México. *Revista internacional de Botánica Experimental* 77: 129-136.
76. Richards G, Beuchat L. 2004. Attachment of *Salmonella poona* to cantaloupe rind and stem scar tissues as affected by temperature of fruit and inoculum. *Journal of Food Protection* 67:1359-1364
77. Ridge PJ, Firestone MK. 2005. Redox fluctuation structures microbial communities in a wet tropical soil. *Applied and Environmental Microbiology* 71(11): 6998-7007.
78. Rosa E. 2004. Conjunto tecnológico para la producción de melón “cantaloupe” y “honeydew”. *Agricultural Experiment* 161.
79. Rush DB, Halpern AL, Sutton G et al. 2007. The sorcerer II global ocean sampling expedition: northwest atlantic through eastern tropical pacific. *PLoS Biology* 5(3): e77.
80. SAGARPA. 2016. Alcanza exportaciones de melón, sandía y papaya 283 millones de dólares. [Online]Disponible:

<http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/2016/octubre/Documents/JAC0429-21.PDF>. Consultado el 23 de enero del 2018

81. Schloss PD, Handelsman J. 2003. Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology* 14(3): 303-310.
82. Schröder JJ, Schulte RPO, Creamer RE, Delgado A, Leeuwen J, Lehtinen T, Rutgers M, Spiegel H, Staes J, Tóth G, Wall DP. 2016. The elusive role of soil quality in nutrient cycling: a review. *Soil Use and Management* 32: 476-486.
83. Secretaria de desarrollo urbano y ecología. 1992. Norma Mexicana a NMX-AA-25-1984: Protección al ambiente-contaminación del suelo-residuos sólidos-determinación del pH-método potenciométrico. [Online] Disponible en: *legismex.mty.itesm.mx/normas/aa/aa025.pdf*. Consultado el 08 de Noviembre del 2017.
84. Sekse C, Jensen H, Dobrindt U, Johannessen GS, Li W, Spilsberg N, Shi J. 2017. High throughput sequencing for detection of foodborne pathogens. *Frontiers in Microbiology* 8:2029.
85. Soto MJ, Sanjuán J, Olivares J. 2006. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology* 152(11): 3167-74.
86. Spiegelman D, Whissell G, Greer CW. 2005. A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Canadian Journal of Microbiology* 51(5): 355-386.
87. Su JQ, Wei B, Xu CY, Qiao M, Zhu YG. 2014. Functional metagenomics characterization of antibiotic resistance genes in agricultural soils from China. *Environment International* 65: 9-15.
88. Telias A, White JR, Pahl DM, Ottesen AR, Walsh CS. 2011. Bacteria community diversity and variation in spray water sources and the tomato fruit surface. *BMC Microbiology* 11:81.
89. Thien SJ. 1979. A flow diagram for teaching texture by feel analysis. *Journal of Agronomic Education* 8:54-55.
90. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett, Knight R, Gordon JI. 2007. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature* 449(7164): 804-810.

91. Turnet TR, James EK, Poole PS. 2013. The plant microbiome. *Genome Biology* 14(6): 209.
92. Varma JK, Samuel MC, Marcus R, *et al.* 2007. *Listeria monocytogenes* infection from foods prepared in a commercial establishment: a case-control study of potential sources of sporadic illness in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 44(4):521-8
93. Zhang Q, Melcher U, Zhou L, Najjar FZ, Roe BA, Fletcher J. 2005. Genomic comparison of plant pathogenic and nonpathogenic *Serratia marcescens* strains by suppressive subtractive hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 71(12): 716-7723.
94. Vivant AL, Garmyn D, Pivetau P. 2013. *Listeria monocytogenes*, a down-to-earth pathogen. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3:97.
95. Wassermann B, Rybakova D, Müller C, Berg G. 2017. Harnessing the microbiomes of *Brassica* vegetables for health issues. *Scientific Reports* 7:17649.
96. Willers C, van Rensburg J, Claassens S. 2015. Phospholipid fatty acid profiling of microbial communities-a review of interpretations and recent applications. *Applied Microbiology* 119:1207-1218.
97. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Yuen KY. 2008. Then and now: use of 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology. *Clinical Microbiology and Infection* 14:908-934.
98. Zhou X, Wu F. 2018. Vanillic acid changed cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedling rhizosphere total bacterial, *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. communities. *Scientific Reports*: 4929.